

PCT National Publication Gazette

National Patent Publication No. 2004-500867

Date of National Publication: January 15, 2004

International Class(es): C12Q 1/68
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 33/53
G01N 37/00

(81 pages in all)

Title of the Invention: NOVEL COMPOSITIONS AND
METHODS FOR ARRAY-BASED
NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION

Patent Appln. No. 2002-502170

Filing Date: April 19, 2001

Date of Filing Translation: December 4, 2002

International Filing No. PCT/US2001/012838

International Publication No. WO2001/094630

International Publication Date: December 13, 2001

Priority Claimed: Country: U.S.A.

Filing Date: June 7, 2000

Serial No. 60/210,153

Inventor(s): Allan BRADLEY and Win Wen CAI

Applicant(s): BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

(transliterated, therefore the
spelling might be incorrect)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500867

(P2004-500867A)

(43) 公表日 平成16年1月15日 (2004.1.15)

(51) Int. Cl.⁷

C12Q 1/68

C12M 1/00

C12N 15/09

G01N 33/53

G01N 37/00

F I

C12Q 1/68

C12M 1/00

G01N 33/53

G01N 37/00

C12N 15/00

Z N A A

A

M

I O 2

F

テーマコード (参考)

4B024

4B029

4B063

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-502170 (P2002-502170)
 (86) (22) 出願日 平成13年4月19日 (2001.4.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月4日 (2002.12.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/012838
 (87) 国際公開番号 WO2001/094630
 (87) 国際公開日 平成13年12月13日 (2001.12.13)
 (31) 優先権主張番号 60/210,153
 (32) 優先日 平成12年6月7日 (2000.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

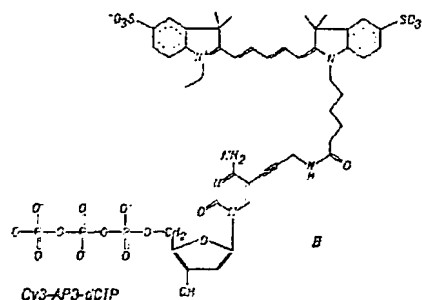
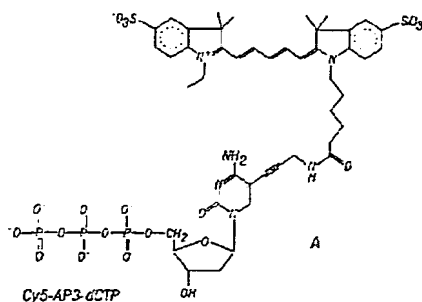
(71) 出願人 591023860
 ベイラー カレッジ オブ メディシン
 BAYLOR COLLEGE OF M
 EDICINE
 アメリカ合衆国, 77030 テキサス,
 ヒューストン, ベイラー プラザ 1 番地
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレイ利用型核酸ハイブリダイゼーションのための新規な組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、ゲノムDNAを表す標識化核酸と固定化した核酸プローブ（例えばアレイまたはバイオチップ）とをハイブリダイズさせることにより該ゲノムDNAの分子プロフィールを作成するための組成物および方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲノム DNA 標的と固定化核酸プローブとのハイブリダイゼーションによりゲノム DNA の分子プロファイルを作成する方法であって、以下のステップ：

- (a) 複数の固定化核酸セグメントを含む複数の核酸プローブを得るステップ；
 - (b) 検出可能な部分で標識されたゲノム核酸断片を含む標的核酸のサンプルを得るステップであって、各標識化断片は約 200 塩基未満の長さからなる、上記ステップ；および
 - (c) ステップ (b) のゲノム核酸とステップ (a) の固定化プローブとを、該標的核酸と該プローブ核酸とがハイブリダイズ可能な条件下にて接触させるステップ；
- を含む、上記方法。

10

【請求項 2】

各標識化断片が約 150 塩基以下の長さからなるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

各標識化断片が約 100 塩基以下の長さからなるものである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

各標識化断片が約 50 塩基以下の長さからなるものである、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

各標識化断片が約 30 塩基以下の長さからなるものである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

各標識化断片が約 30 塩基～約 150 塩基の長さからなるものである、請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 7】

標的ゲノム核酸のサンプルが、ゲノム核酸のサンプルのランダムプライミング、ニックトランスレーション、増幅、またはその等価の手法を含む手法を使用して標的ゲノム核酸のセグメントを作製し、その後、該セグメントの断片化または酵素消化、あるいはその両方を含むステップにより約 200 塩基未満のサイズからなる標的ゲノム核酸のサンプルを生成することにより調製されるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

標的ゲノム核酸のセグメントを作製するための、ゲノム核酸のサンプルのランダムプライミング、ニックトランスレーション、増幅、またはその等価な手法が、検出可能な標識を付加した塩基対を該セグメント中に組み込むものである、請求項 7 記載の方法。

30

【請求項 9】

検出可能な標識が Cy 3TM もしくは Cy 5TM またはその等価物を含む、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

標的ゲノム核酸のサンプルが、セグメントの DNase 酵素またはその等価物を用いた消化による約 200 塩基未満のサイズへのゲノム DNA の断片化を含む手法を用いて調製されるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

標的ゲノム核酸のサンプルが、ゲノム DNA を断片化するのに十分な剪断力を適用することによる約 200 塩基未満のサイズへのゲノム DNA の断片化と、続いて剪断した DNA の DNase 酵素またはその等価物による消化を含む手法を用いて調製されるものである、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 12】

標的核酸とプローブ核酸とがハイブリダイズ可能な条件がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を含むものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が約 60℃～約 65℃の温度を含むものである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

50

標的核酸がヒト由来のDNAから本質的に構成されるものである、請求項1記載の方法。

【請求項15】

標的ゲノム核酸のサンプルが染色体の所定の一部または実質的に全体を表す配列を含むものである、請求項1記載の方法。

【請求項16】

標的ゲノム核酸のサンプルがゲノムの実質的に全体を表す配列を含むものである、請求項15記載の方法。

【請求項17】

染色体またはゲノムがヒトに由来するものである、請求項15または16記載の方法。

【請求項18】

少なくとも1つの検出可能な部分で標識されたゲノム核酸の断片を含む標的核酸のサンプルを含む組成物であって、各標識化断片は約200塩基未満の長さを有し、該標識化標的ゲノム核酸のサンプルは、染色体の所定の一部もしくは実質的に完全な染色体または実質的に完全なゲノムを表す配列を含むものである、上記組成物。

【請求項19】

標的核酸がヒト由来のDNAから本質的に構成されるものである、請求項18記載の組成物。

【請求項20】

染色体またはゲノムが哺乳動物由来のDNAである、請求項18記載の組成物。

【請求項21】

DNAがヒト由来のDNAである、請求項20記載の組成物。

【請求項22】

各標識化断片が約100塩基以下の長さからなるものである、請求項18記載の組成物。

【請求項23】

各標識化断片が約50塩基以下の長さからなるものである、請求項22記載の組成物。

【請求項24】

各標識化断片が約50塩基以下の長さからなるものである、請求項23記載の組成物。

【請求項25】

各標識化断片が約30塩基～約100塩基の長さからなるものである、請求項22記載の組成物。

【請求項26】

検出可能な標識がCy3TMもしくはCy5TMまたはその等価物を含むものである、請求項18記載の組成物。

【請求項27】

標的核酸のサンプルおよび印刷物を含むキットであって、該標的核酸は検出可能な部分で標識されたゲノム核酸の断片を含み、各標識化断片は約200塩基未満の長さからなり、該標識化標的ゲノム核酸のサンプルは、染色体またはゲノムの実質的に全体を表す配列を含み、該印刷物は標的核酸のサンプルと核酸アレイとのハイブリダイゼーションに関する説明書を含む、上記キット。

【請求項28】

標識化核酸標的のサンプルと複数の核酸プローブとをハイブリダイズさせる方法であって、以下のステップ：

(a) 蛍光標識化核酸断片を含む核酸標的のサンプル、および複数の核酸プローブを得るステップであって、該蛍光標識は酸化を受けやすいものである、上記ステップ；

(b) ステップ(a)の核酸標的と核酸プローブとを、該サンプルと該プローブとがハイブリダイズ可能な条件下で接触させるステップであって、該ハイブリダイゼーション条件は、少なくとも1種の抗酸化剤を含むハイブリダイゼーション溶液の使用を含むものである、上記ステップ；

を含み、上記溶液中の抗酸化剤の量は、ハイブリダイゼーション条件下で蛍光標識の酸化を阻害するのに十分なものである、上記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

蛍光標識が Cy 5TM またはその等価物を含むものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

蛍光色素が、ローダミン、フルオレセインもしくはアリール置換型 4, 4-ジフルオロ-4-ボラー-3a, 4a-ジアザー-インダセン色素、またはその等価物を含むものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】

抗酸化剤が約 25 mM ~ 約 1000 mM の濃度でハイブリダイゼーション溶液中に存在するものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】

抗酸化剤が約 50 mM ~ 約 500 mM の濃度でハイブリダイゼーション溶液中に存在するものである、請求項 31 記載の方法。

10

【請求項 33】

抗酸化剤がメルカプト含有化合物を含むものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 34】

メルカプト含有化合物が、2-メルカプトエチルアミン、チオールN-アセチルシステイン、オボチオール、または4-メルカプトイミダゾールを含むものである、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

抗酸化剤が抗酸化性ビタミン含有化合物を含むものである、請求項 28 記載の方法。

20

【請求項 36】

抗酸化性ビタミン含有化合物がアスコルビン酸（ビタミンC）またはトコフェロール（ビタミンE）を含むものである、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

抗酸化剤が没食子酸プロピルを含むものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 38】

抗酸化剤がβカロテンを含むものである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 39】

抗酸化剤がブチルヒドロキシトルエン（BHT）またはブチルヒドロキシアニソール（BHA）を含むものである、請求項 28 記載の方法。

30

【請求項 40】

少なくとも1種の抗酸化剤を含む溶液中に Cy 5TM 標識化核酸またはその等価物のサンプルを含む組成物。

【請求項 41】

抗酸化剤が約 25 mM ~ 約 1000 mM の濃度でハイブリダイゼーション溶液中に存在するものである、請求項 40 記載の組成物。

【請求項 42】

抗酸化剤が約 50 mM ~ 約 500 mM の濃度でハイブリダイゼーション溶液中に存在するものである、請求項 41 記載の組成物。

【請求項 43】

抗酸化剤がメルカプト含有化合物を含むものである、請求項 40 記載の組成物。

40

【請求項 44】

メルカプト含有化合物が2-メルカプトエチルアミン、チオールN-アセチルシステイン、オボチオール、または4-メルカプトイミダゾールを含むものである、請求項 43 記載の組成物。

【請求項 45】

抗酸化剤が抗酸化性ビタミン含有化合物を含むものである、請求項 40 記載の組成物。

【請求項 46】

抗酸化性ビタミン含有化合物がアスコルビン酸（ビタミンC）またはトコフェロール（ビタミンE）を含むものである、請求項 45 記載の組成物。

50

【請求項 47】

抗酸化剤が没食子酸プロピルを含むものである、請求項 40 記載の方法。

【請求項 48】

抗酸化剤がβカロテンを含むものである、請求項 40 記載の方法。

【請求項 49】

抗酸化剤がブチルヒドロキシトルエン（BHT）またはブチルヒドロキシアニソール（BHA）を含むものである、請求項 40 記載の方法。

【請求項 50】

少なくとも 1 種の抗酸化剤を含む溶液中の蛍光色素で標識した核酸またはその等価物のサンプル、および印刷物を含むキットであって、該印刷物が蛍光色素標識化核酸を別の核酸とのハイブリダイゼーション反応において使用することに関する説明書である、上記キット。

10

【請求項 51】

少なくとも 1 種の抗酸化剤を含むハイブリダイゼーション複合体洗浄溶液をさらに含むものである、請求項 50 記載のキット。

【請求項 52】

蛍光色素が Cy 5TM またはその等価物を含むものである、請求項 50 記載のキット。

【請求項 53】

蛍光色素が、ローダミン、フルオレセインもしくはアリール置換型 4, 4-ジフルオロ-4-ボラー 3a, 4a-ジアザ-s-インダセン色素、またはその等価物を含むものである、請求項 50 記載のキット。

20

【請求項 54】

核酸標的のサンプルと複数の固定化核酸プローブとをハイブリダイズさせる方法であって、以下のステップ：

（a）核酸標的のサンプルおよび複数の固定化核酸プローブを得るステップ；

（b）ステップ（a）の核酸標的と核酸プローブとを、該サンプルと該プローブとがハイブリダイズ可能な条件下で接触させるステップであって、該ハイブリダイゼーション条件が不飽和湿度環境を含む制御されるハイブリダイゼーション環境を含むものである、上記ステップ；

を含む、上記方法。

30

【請求項 55】

不飽和湿度環境が、約 90% 湿度、約 80% 湿度、約 70% 湿度、約 60% 湿度、約 50% 湿度、約 40% 湿度、約 30% 湿度または約 20% 湿度に制御されるものである、請求項 54 記載の方法。

【請求項 56】

制御される環境の湿度がステップ（b）のハイブリダイゼーションの間に周期的に変化するものである、請求項 54 記載の方法。

【請求項 57】

湿度が、約 3 時間間隔、約 2 時間間隔、約 1 時間間隔、約 30 分間隔、約 15 分間隔もしくは約 5 分間隔で、またはこれらの組合せにおいて周期的に変化するものである、請求項 56 記載の方法。

40

【請求項 58】

ハイブリダイゼーション条件が制御される温度環境を含むものである、請求項 54 記載の方法。

【請求項 59】

制御される環境の温度がステップ（b）のハイブリダイゼーションの間に周期的に変化するものである、請求項 58 記載の方法。

【請求項 60】

温度が、約 3 時間間隔、約 2 時間間隔、約 1 時間間隔、約 30 分間隔、約 15 分間隔もしくは約 5 分間隔で、またはこれらの組合せにおいて周期的に変化するものである、請求項

50

5 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

ハウジング中の固定化核酸のアレイを含む組成物であって、該ハウジングが該ハウジング中の温度を測定および制御するためのコンポーネントを含むものである、上記組成物。

【請求項 6 2】

ハウジングがさらに該ハウジング中の温度を測定および制御するためのコンポーネントを含むものである、請求項 6 1 記載の組成物。

【請求項 6 3】

ハウジングがさらに温度および湿度の制御をプログラム化または初期設定することが可能なコンポーネントを含むものである、請求項 6 2 記載の組成物。

【請求項 6 4】

湿度制御されたハウジング中の固定化プローブ核酸のアレイであって、該ハウジングは、該プローブとハイブリダイゼーション水溶液中の標的とのハイブリダイゼーションの間に該ハウジング中の湿度量を制御するための手段を含むものである、上記アレイ。

【請求項 6 5】

湿度制御されたハウジング中の固定化プローブ核酸のアレイであって、該ハウジングは、該プローブとハイブリダイゼーション水溶液との接触の間に該ハウジング中の湿度量を制御可能な加湿コンポーネントを含むものである、上記アレイ。

【請求項 6 6】

ハウジング中の固定化核酸のアレイおよび印刷物を含むキットであって、該ハウジングは、該ハウジング中の湿度量を制御するためのコンポーネント、該ハウジング中の温度を制御するためのコンポーネント、ならびに湿度および温度の制御を初期設定またはプログラム化するためのコンポーネントを含み、該印刷物は該ハウジング中の条件を初期設定またはプログラム化して、核酸ハイブリダイゼーションステップの間の湿度および温度の変動を含む制御されたハイブリダイゼーション条件下で標的とアレイの固定化核酸とをハイブリダイズさせるための説明書を含む、上記キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

連邦政府支援研究に関する表明

本発明は、国立保健研究所からの助成金番号 R 2 1 C A 8 3 2 1 1 の下、政府の支援を得て成された。本発明に関して、政府は一定の権利を有し得る。

【0002】

技術分野

本発明は、分子生物学、遺伝子診断、および核酸アレイ、すなわち「バイオチップ」技術に関する。特に、本発明は、アレイ利用型核酸ハイブリダイゼーションのための新規な方法および組成物を提供する。

【0003】

背景

ゲノム DNA マイクロアレイを利用する比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) は、個々の中期染色体に対する比較ハイブリダイゼーションに依存する従来の CGH 法の多くの限界を解決する可能性を持っている。中期 CGH では、ゲノム DNA の異なるサンプルの多メガベース (Mb) の断片 (例えば、既知正常のもの、対、被験体 (例えば、可能性のある腫瘍)) を標識化し、固定化された染色体とハイブリダイズさせる (例えば、Breen (1999) J. Med. Genetics 36: 511-517; Rice (2000) Pediatric Hematol. Oncol. 17: 141-147 を参照)。既知サンプルと被験サンプルとのシグナルの差を検出および測定する。このようにして、「正常」と比べた場合に被験サンプルにおいて欠損している配列、増幅している配列、またはユニークな配列を、正常対照対被験ゲノム DNA の蛍光比により検出できる。中期 CGH では、(固定化染色体上の) 標的部位は、過剰量の可溶性標識化ゲノム DNA により飽和される。

10

20

30

40

【0004】

固定化ゲノムDNAが中期に存在するものである中期CGHと対照的に、アレイ利用型CGH法では、例えばバイオチップまたはマイクロアレイプラットフォーム上に固定化核酸がアレイとして配置される。別の違いは、アレイ利用型CGHでは、標識化（被験および対照）ゲノム核酸のコピー数と比べて固定化ゲノムDNAがモル量で過剰であることである。このような条件下では、固定化DNA上での反復ゲノム配列および交差ハイブリダイゼーションを抑制することが、正常対照サンプルと被験サンプルとのコピー数の差の信頼性のある検出および定量のために非常に有益である。しかし、従来のプロトコルを使用すると、このような抑制は、最適には達しない。さらに、ゲノムDNAは、30%を上回る反復配列、およびさらに未知の割合の関連性のある配列を含む雑多な混合物である。これらの配列は、従来のプロトコルを用いて被験およびサンプルDNAをアレイへのハイブリダイゼーションのために調製した場合に交差ハイブリダイズする可能性がある。

10

【0005】

概要

本発明は、ゲノムDNA標的と固定化核酸プローブとのハイブリダイゼーションによりゲノムDNAの分子プロフィールを作成する方法であって、次のステップ：（a）複数の固定化核酸セグメントを含む複数の核酸プローブを得るステップ；（b）検出可能な部分で標識されたゲノム核酸の断片を含む標的核酸のサンプルを得るステップであって、該標識化断片はそれぞれ約200塩基未満の長さからなる、上記ステップ；ならびに（c）ステップ（b）のゲノム核酸とステップ（a）の固定化プローブとを、該標的核酸と該プローブ核酸とがハイブリダイズ可能な条件下で接触させるステップ、を含む方法を提供する。

20

【0006】

代替的な実施形態では、各標識化断片は、約175塩基以下；150塩基以下；約125塩基以下；約100塩基以下；約75塩基以下；約50塩基以下；約40塩基以下；約30塩基以下；および約25塩基以下の長さからなる。別の実施形態では、各標識化断片は、約25から約30塩基～約100塩基の長さからなる。これらの標的ゲノム核酸のサンプルは、ゲノム核酸のサンプルのランダムプライミング、ニックトランスレーション、または増幅を含む手法を使用して標的ゲノム核酸のセグメントを作製し、その後、セグメントの断片化または酵素消化を含むステップにより約200塩基未満のサイズからなる標的ゲノム核酸のサンプルを生成することにより調製できる。他の実施形態では、標的ゲノム核酸のサンプルをさらに、ゲノム核酸（ニックトランスレーション、ランダムプライミングまたは増幅により作製された標識化核酸を含む）の機械的断片化（例えば、剪断）もしくは酵素的消化（例えばDNase酵素）またはその等価物の消化を含む手法を使用して、約200塩基未満、または約175塩基；約150塩基；約125塩基；約100塩基；約75塩基；約50塩基；約40塩基；約30塩基；もしくは約25塩基未満のサイズに（例えば断片化して）調製する。別の実施形態では、ゲノムDNAを断片化するのに十分な剪断力をかけることにより約200塩基未満のサイズにゲノムDNAを断片化すること、その後、剪断されたDNAをDNaseまたはその等価物の酵素消化により約200塩基未満、または約150塩基；約125塩基；約100塩基；約75塩基；約50塩基；約40塩基；約30塩基；もしくは約25塩基未満のサイズにすることを含む手法を使用することにより、標的ゲノム核酸のサンプル（ニックトランスレーション、ランダムプライミングまたは増幅により作製された標識化標的核酸を含む）を調製する。

30

40

【0007】

この方法において、標的核酸とプローブ核酸とがハイブリダイズ可能な条件は、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件、あるいはまた、ストリンジентな洗浄条件も含むことができる。代替的な実施形態では、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、約55℃から約60℃から約65℃の温度を含み得る。別の実施形態では、ハイブリダイゼーションの温度は、ハイブリダイゼーションステップの間に少なくとも1回（または複数回）変更する。また、以下に記載するように、ハイブリダイゼーションを行う温度（すなわち水蒸気）量、ハイブリダイゼーションステップの間に少なくとも1回ま

50

たは数回変更してもよい。温度および／または温度の変化は、段階的であっても徐々に行ってもよい。変化は、ハイブリダイゼーション手順の間、または任意の一部のハイブリダイゼーションステップにわたって継続し得る。

【0008】

一実施形態では、ゲノム核酸のサンプルのランダムプライミング、ニックトランスレーションまたは増幅（例えば、変性プライマーを使用して行う）を使用して、検出可能に標識化された塩基対をセグメント中に組み入れた標的ゲノム核酸のセグメントを生成する。あるいはまた、検出可能な部分を塩基対に付着させるように、組み込まれる塩基対が修飾塩基であってもよいしまたは合成類似塩基対であってもよい。一実施形態では、検出可能な標識は、蛍光色素、例えば Cy 3TM もしくは Cy 5TM またはその等価物、ローダミン、フルオレセイン、またはアリール置換型 4, 4'-ジフルオロ-4'-ボラー 3 a, 4 a-ジアザ-s-インダセン色素もしくはその等価物を含む。

10

【0009】

一実施形態では、標的核酸は、ヒト由来の DNA から本質的に構成される。標的ゲノム核酸のサンプルは、染色体の所定の断片、または実質的に 1 つ以上の染色体全体を表す配列を含み得る。標的ゲノム核酸のサンプルは、実質的にゲノム全体を表す配列を含むことができる。代替的な実施形態では、標的またはプローブ核酸が誘導される DNA は、マウスまたはヒトゲノムなどの哺乳動物に由来する。

【0010】

本発明はまた、少なくとも 1 つの検出可能な部分で標識化されたゲノム核酸の断片を含む標的核酸のサンプルを含む組成物を提供し、該標識化された断片はそれぞれ約 200 塩基未満の長さからなり、該標識化標的ゲノム核酸のサンプルは、実質的に完全な染色体または実質的に完全なゲノムを表す配列を含むものである。代替的な実施形態では、標的ゲノム核酸は、約 175 塩基；約 150 塩基；約 125 塩基；約 100 塩基；約 75 塩基；約 50 塩基；約 40 塩基；約 30 塩基；または約 25 塩基未満のものである。別の実施形態では、それぞれの標識化断片は、約 30 塩基～約 150 塩基の長さからなる。一実施形態では、組成物の標的核酸は、ヒト由来の DNA から本質的に構成される。標的ゲノム核酸のサンプルは、染色体の所定の断片または実質的に 1 つ以上の染色体全体を表す配列を含むことができる。標的ゲノム核酸のサンプルは、実質的にゲノム全体を表す配列を含むことができる。代替的な実施形態では、ゲノムは、マウスまたはヒトゲノムなどの哺乳動物ゲノムを含む。代替的な実施形態では、組成物は任意の検出可能な標識を含むことができる（例えば、Cy 3TM または Cy 5TM を含むことができる）。

20

30

【0011】

本発明はまた、標的核酸のサンプルおよび印刷物を含むキットを提供し、該標的核酸は検出可能な部分で標識されたゲノム核酸の断片を含み、各標識化断片はそれぞれ約 200 塩基未満の長さからなり、該標識化標的ゲノム核酸のサンプルは染色体またはゲノムの所定の一部または実質的に全体を表す配列を含み、該印刷物は該標的核酸のサンプルと核酸アレイとのハイブリダイゼーションについての説明書を含むものである。代替的な実施形態では、キットの標的ゲノム核酸は、約 175 塩基；約 150 塩基；約 125 塩基；約 100 塩基；約 75 塩基；約 50 塩基；約 40 塩基；約 30 塩基；または約 25 塩基未満のものである。代替的な実施形態では、標的またはプローブが誘導されるゲノム DNA は、マウスまたはヒトゲノムなどの哺乳動物由来のゲノムを含む。

40

【0012】

本発明は、標識化核酸標的のサンプルと複数の核酸プローブとをハイブリダイズさせる方法を提供し、該方法は、(a) 蛍光標識化核酸断片を含む核酸標的のサンプルおよび複数の核酸プローブを得るステップであって、該蛍光標識は酸化を受け易いものである、上記ステップ；ならびに (b) ステップ (a) の核酸標的と核酸プローブとを、該サンプルと該プローブとがハイブリダイズ可能な条件下で接触させるステップであって、該ハイブリダイゼーション条件は、少なくとも 1 種の抗酸化剤を含むハイブリダイゼーション溶液の使用を含む、上記ステップを含み、上記溶液中の抗酸化剤の量は該ハイブリダイゼーシ

50

ン条件下で蛍光標識の酸化を阻害するのに十分な量である。一実施形態では、蛍光標識は $Cy5^TM$ またはその等価物を含む。代替的な実施形態では、蛍光色素はローダミン、フルオレセイン、またはアリール置換型 4, 4'-ジフルオロ-4'-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン色素またはその等価物を含む。

【0013】

本発明はまた、 $Cy5^TM$ 標識化核酸標的のサンプルと複数の核酸プローブとをハイブリダイズさせる方法を提供し、該方法は、(a) $Cy5^TM$ 標識化核酸断片を含む核酸標的のサンプルおよび複数の核酸プローブを得るステップ；ならびに (b) ステップ (a) の核酸標的と核酸プローブとを、該サンプルと該プローブとがハイブリダイズ可能な条件下で接触させるステップであって、該ハイブリダイゼーション条件は、少なくとも1種の抗酸化剤を含むハイブリダイゼーション溶液の使用を含むものである、上記ステップを含み、上記溶液中の抗酸化剤の量はハイブリダイゼーション条件下で $Cy5^TM$ の酸化を阻害するのに十分な量である。本発明は、少なくとも1種の抗酸化剤を含む $Cy5^TM$ 標識化核酸を含む洗浄溶液を提供し、該溶液中の抗酸化剤量はハイブリダイゼーション条件下で $Cy5^TM$ の酸化を阻害するのに十分な量である。

【0014】

本発明は、少なくとも1つの抗酸化剤を含む溶液中に $Cy5^TM$ 標識化核酸のサンプルを含む組成物を提供する。

【0015】

本発明はまた、少なくとも1つの抗酸化剤を含む溶液中の蛍光標識化核酸のサンプルと、別の核酸とのハイブリダイゼーション反応における該標識化核酸の使用に関する説明書を含む印刷物とを含むキットを提供する。代替的な実施形態では、蛍光色素はローダミン、フルオレセイン、またはアリール置換型 4, 4'-ジフルオロ-4'-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン色素またはその等価物を含む。本発明はまた、少なくとも1つの抗酸化剤を含む溶液中の $Cy5^TM$ 標識化核酸のサンプルと、別の核酸とのハイブリダイゼーション反応における該 $Cy5^TM$ 標識化核酸の使用に関する説明書を含む印刷物とを含むキットも提供する。本キットは、少なくとも1つの抗酸化剤を含む洗浄溶液などの洗浄溶液をさらに含んでもよい。

【0016】

代替的な実施形態では、溶液（例えば、ハイブリダイゼーション溶液、洗浄溶液および／または他の溶液）中に抗酸化剤が、約 25 mM～約 1 M、約 50 mM～約 750 mM、約 50 mM～約 500 mM、および約 100 mM～約 500 mM の濃度で存在する。

【0017】

上記組成物および方法において、代替的な実施形態では、抗酸化剤は、メルカプト含有化合物またはその等価物、例えば、2-メルカプト-エチルアミン、チオールD-アセチルシステイン、オボチオール、4-メルカプトイミダゾールなどを含む。別の実施形態では、抗酸化剤は、アスコルビン酸（ビタミンC）、またはトコフェロール（ビタミンE）、またはその等価物などの抗酸化性ビタミン含有化合物を含む。別の実施形態では、抗酸化剤は、n-没食子酸プロピルなどの没食子酸プロピル、またはその等価物を含む。別の実施形態では、抗酸化剤はβカロチンまたは等価物を含む。別の実施形態では、抗酸化剤は、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）もしくはブチルヒドロキシアニソール（BHA）、またはその等価物を含む。

【0018】

本発明は、核酸標的のサンプルと複数の固定化核酸プローブとをハイブリダイズさせる方法を提供し、該方法は、(a) 核酸標的のサンプルおよび複数の固定化核酸プローブを得るステップ；ならびに (b) ステップ (a) の核酸標的と核酸プローブとを、該サンプルと該プローブとがハイブリダイズ可能な条件下で接触させるステップであって、該ハイブリダイゼーション条件は、不飽和温度環境を含む制御されたハイブリダイゼーション環境を含むものである。代替的な実施形態では、不飽和温度環境を、約 90% の温度、約 80

10

20

30

40

50

%の湿度、約70%の湿度、約60%の湿度、約50%の湿度、約40%の湿度、約30%の湿度、および約20%の湿度に制御する。

【0019】

一実施形態では、制御された環境の湿度を、ステップ(b)のハイブリダイゼーションの間に周期的に変化させる。変化は、段階的でも徐々であってもよい。湿度は、任意の回数かつ任意の時間の長さで変化させることができる。代替的な実施形態では、湿度は、約3時間間隔、約2時間間隔、約1時間間隔、約30分間隔、約15分間隔もしくは約5分間隔、またはそれらの組合せで周期的に変化させる。

【0020】

一実施形態では、ハイブリダイゼーション条件は、制御された温度環境を含む。制御された環境の温度は、ステップ(b)のハイブリダイゼーションの間に周期的に変化させることができる。変化は、段階的でも徐々であってもよい。温度は、任意の回数かつ任意の時間の長さで変化させる。代替的な実施形態では、温度は、約3時間間隔、約2時間間隔、約1時間間隔、約30分間隔、約15分間隔もしくは約5分間隔、またはそれらの組合せで周期的に変化させる。

【0021】

本発明は、ハウジング中の湿度を測定および制御するためのコンポーネントを含むハウジング中の固定化核酸のアレイを含む組成物を提供する。一実施形態では、ハウジングは、ハウジング中の湿度を測定および制御するためのコンポーネントをさらに含む。ハウジングは、湿度および温度の制御をプログラム化または初期設定することが可能なコンポーネントをさらに含んでもよい。

【0022】

本発明は、湿度制御されたハウジング中の固定化プローブ核酸のアレイを提供し、該ハウジングは、該プローブとハイブリダイゼーション水溶液中の標的とのハイブリダイゼーションの間に該ハウジング中の湿度量を制御するための手段を含むものである。

【0023】

本発明は、湿度制御されたハウジング中の固定化プローブ核酸のアレイを提供し、該ハウジングは、該プローブとハイブリダイゼーション水溶液との接触の間に該ハウジング中の湿度量を制御可能な加湿コンポーネントを含むものである。

【0024】

本発明は、ハウジング中の固定化核酸のアレイと、印刷物とを含むキットを提供し、該ハウジングは該ハウジング中の湿度量を制御するためのコンポーネント、該ハウジング中の湿度を制御するためのコンポーネント、ならびに湿度および温度の制御を初期設定またはプログラム化するためのコンポーネントを含み、該印刷物は該ハウジング中の条件を初期設定またはプログラム化して、核酸ハイブリダイゼーションステップの間の湿度および温度の変動を含む制御されたハイブリダイゼーション条件下で標的とアレイの固定化核酸とをハイブリダイズさせるための説明書を含むものである。

【0025】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細については、添付の図面および以下の記載において説明する。本発明の他の特徴、目的および利点は、詳細な説明、図面および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0026】

ここで、本明細書で引用する全ての文献、特許、特許出願、GenBank配列、およびATCC寄託物は全てあらゆる目的のために参照により本明細書に援用する。

【0027】

詳細な説明

本発明は、アレイ利用型核酸ハイブリダイゼーションのための新規な方法および組成物を提供する。例えば、「アレイ利用型比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGHI)」におけるように、ゲノムDNAから誘導した標的核酸と固定化核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより、ゲノムDNAの分子プロフィールを作成するための新規な方法および

10

20

30

40

50

組成物を提供する。

【0028】

一実施形態では、本発明は、ゲノムDNAから誘導された標的核酸と、例えばアレイ形式の固定化核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより、1つ以上のゲノム、またはゲノムの所定の一部（例えば、染色体または染色体の一部）の分子プロファイルを作成する方法を提供する。本方法は、固定化核酸セグメント（例えば、クローン化DNA）と、検出可能な部分で標識されたゲノム核酸の断片を含む標的核酸のサンプルとを接触させることを含む。標識化断片はそれぞれ、約200塩基未満の長さからなる。この小さいサイズに限定された標識化ゲノムDNAを使用することで、例えばアレイ利用型CGHにおける分子プロファイル分析の解像度が有意に改善される。例えば、このような小さい断片を使用することによって、固定化核酸上での反復配列および他の所望でない「バックグラウンド」交差ハイブリダイゼーションを有意に抑制することが可能となる。反復配列ハイブリダイゼーションの抑制は、コピー数の差（例えば、増幅もしくは欠失）の検出またはユニークな配列の検出の信頼性を非常に高める。

【0029】

標識化ゲノムDNAは、30%を上回る反復配列、およびさらに未知の割合の関係の近い配列を含む雑多な混合物である。従来のプロトコール、特にCGH法は、本発明の組成物および方法の（約200塩基未満の）断片よりも有意に長い標識化ゲノム断片を使用して、固定化ゲノムDNA（例えば、固定化中期染色体または核酸アレイ）とハイブリダイズさせる。これらの長い配列は、反復配列および関係の近い配列との無視できない量の所望でない交差ハイブリダイゼーションを生じさせる。約200塩基未満の標識化標的ゲノム核酸を使用して本発明の方法を実施することで、従来のプロトコールを使用した場合に見とめられる反復配列ハイブリダイゼーションおよび関係の近い配列からの交差ハイブリダイゼーションの量が有意に減少する。解像度も有意に高くなり得る。

【0030】

本発明は、特定の作用メカニズムに限定されるものではないが、本発明の方法の優れた有効性は、小さいサイズ（すなわち、約200残基未満）に断片化されたDNAプローブが、中程度またはストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件（例えば、アレイ利用型CGHで典型的に使用される条件）下で、関係の近い配列に部分的にハイブリダイズする可能性が低いことに帰するかもしれない。標的配列が十分に小さい場合、特にストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下では、完全に適合した配列のみが特定のハイブリダイゼーション温度においてハイブリダイズする。例えば、一つの計画例では、2つの200塩基DNA分子が、65℃にて100塩基が対合して二重らせん分子を形成する；2本の100塩基一本鎖ぶら下がり端部が残る。これらの「ぶら下がり」一本鎖端部は、他のDNA分子にさらにハイブリダイズする可能性がある。しかし、分子の一方または両方のサイズが200塩基未満になるに伴い（ハイブリダイズするセグメントは100塩基のまま）、「ぶら下がり端部」のサイズは小さくなり、非ハイブリダイズ端部がさらに別のDNA断片とハイブリダイズする（そして「凝集ハイブリダイゼーション」を生じる）可能性も比例して減少する。アレイ利用型CGHなどのマイクロアレイハイブリダイゼーションでは、この「凝集ハイブリダイゼーション」は、ハイブリダイゼーションの定量的性を低くするだけでなく、高いバックグラウンドも生じる。従って、本発明の組成物および方法は、約200塩基未満（例えば、約25から約30～約150塩基、または約50～約100塩基）の範囲のサイズの断片化DNAプローブを提供する。一実施形態では、ゲノムDNAから誘導した標識化核酸の断片を、まず、ランダムプライミング、ニックトランスレーション、増幅、またはその等価な手法により調製する。その後、約200塩基未満、約25～約30塩基程度の小さいサイズに断片化する。ランダムプライミング、ニックトランスレーション、または変性プライマーを用いた増幅は、典型的に約200～約500塩基のサイズにわたる標識化断片を生成する。剪断力を用いて、この標識化核酸を断片化できる。しかし、剪断により、DNAを200塩基未満のサイズに断片化することは非常に難しい。従って、追加の技術（例えばDNaseによる酵素消化または等価な手

10

20

30

40

50

法)を使用して、本発明の方法および組成物における標的として使用する小さい標識化断片を生成する。

【0031】

固定化アレイDNAとハイブリダイズさせるために用いる標識化ゲノム核酸のサイズを制御することに加えて、本発明はまた、溶液中(特にハイブリダイゼーション溶液中)での酸化を受け易い核酸-標識コンジュゲートの安定性を高める組成物および方法も提供する。フリーラジカルを含む酸化剤に感受性を有する標識としては、多数の蛍光色素(特にCy 5TM)が挙げられる。蛍光色素の酸化は、その検出可能なシグナルを伝達する能力を弱める。従って、色素を酸化させることができる組成物または条件の存在は、ハイブリダイゼーション反応の結果に悪影響を与え得る。これは、ハイブリダイゼーションシグナルを定量的に検出および分析する場合に特に重要である。従って、本発明の組成物および方法における抗酸化剤およびフリーラジカル形成阻害剤の使用により、例えば蛍光体(fluor)からの検出可能なシグナルのレベルを有意に高めることができる。非常に低いまたは少量の蛍光体を検出する必要がある場合にはさらに少量の蛍光体の保護が重大となり得る。

【0032】

比較ハイブリダイゼーション(CGH)の現行の体系の1つとして、蛍光色素Cy 3TMおよびCy 5TMを使用して、2つのサンプルからの核酸断片(例えば対照対被験細胞または組織から得た核酸)を区別をつけて(示差的に)標識化することがある。Cy 3TMおよびCy 5TMは、それらの優れたスペクトル特性および安定性のために、現行の比較ハイブリダイゼーションプロトコールにおいてほぼ独占的に使用されている。多くの市販の機器がこれらの2つの色素の検出に適応するように設計されている。

【0033】

しかし、Cy 5TMは、現在使用されているほとんどのハイブリダイゼーション溶液中で安定しない。本発明の以前は、標識化反応におけるCy 5TMシグナルの損失は、Cy 5TM取り込み率が低いせいだと誤って考えられていた。Cy 5TM利用コンジュゲートの核酸断片への取込みは、典型的にゲノムDNAサンプルのプライマー伸長により生じる。本発明は、任意の特定の作用メカニズムに限定されるものではないが、本発明者らは、高い温度における(例えばアレイ利用型CGHハイブリダイゼーションおよび他のストリンジェントなハイブリダイゼーション手順において使用する温度における)Cy 5TMの不安定性は、ラジカル攻撃を受け易い分子骨格にある長い不飽和炭素鎖によるものであることを見出した。Cy 5TMもしくは蛍光色素または他の酸化を受けやすい化合物の安定性を高めるために、本発明は、ハイブリダイゼーション混合物(一実施形態では、ハイブリダイゼーションおよび洗浄溶液)に、抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーを取り込む方法および組成物を提供する。本発明の方法および組成物を用いれば、Cy 5TMシグナルが劇的に高まり、より長いハイブリダイゼーション時間が可能になる。

【0034】

ハイブリダイゼーション感度をさらに高めるために、本発明は、新規なハイブリダイゼーション形式、すなわち方法を提供する。本発明の一実施形態では、制御された不飽和湿度環境においてハイブリダイゼーションを行う(現行の方法/プロトコールは、典型的に100%またはほぼ飽和状態の湿度を使用する、例えばShalon(1996) Genome Res. 6:639-6450を参照)。本発明のこの実施形態では、ハイブリダイゼーション効率が、湿度が飽和状態でない場合に有意に改善された。

【0035】

本発明の別の実施形態では、湿度が動的に制御された場合に(すなわち、ハイブリダイゼーションの間に湿度が変化した場合に)、ハイブリダイゼーション効率がさらに改善される。動的に均質化した湿度環境では物質伝達が促進されうる。ハイブリダイゼーション環境における湿度は、段階的または継続的に調節され得る。ハウジングと、ハイブリダイゼーション前段階、ハイブリダイゼーション段階、洗浄段階および/または検出段階の間に操作者が湿度を制御できるようにする制御器とを含むアレイ装置も提供する。一実施形態

では、本装置は、検出コンポーネント、制御コンポーネントおよびメモリコンポーネントを有して、ハイブリダイゼーション前ステップ、ハイブリダイゼーションステップ、洗浄ステップ、および検出ステップを含む全手順サイクルの間の温度（ならびに温度（以下参照）および他のパラメータ）の前もったプログラム化を可能にする。

【0036】

本発明の新規なハイブリダイゼーション方法はまた、温度変動を含むハイブリダイゼーション条件を提供する。温度が制御可能に変化する場合に見とめられるのと同様に、物質伝達も動的に均衡化された温度環境においても促進される。ハイブリダイゼーションは、温度が正確または比較的一定（例えば、大半の市販の炉のように $\pm 2 \sim 3^\circ\text{C}$ ほど）のレベルに設定されている条件に比べて、温度変化環境においてより良い効率を有する。本発明は、任意の特定の作用メカニズムに限定されるものではないが、温度または温度変動のいずれかにより生じる混合（mixing）はハイブリダイゼーション効率を高める。上記したように、本発明はまた、正確に制御された環境（温度、湿度および他の要素の動的制御を含む）条件下でアレイ利用型ハイブリダイゼーションを行うための装置も提供する。反応チャンバー温度は、例えば炉もしくは温度変化を作れる他の装置により変動的に変えられ得る。

10

【0037】

本発明の新規ハイブリダイゼーション方法は、浸透変動を含むハイブリダイゼーション条件も提供する。ハイブリダイゼーション効率（すなわち、平衡に対する時間）も、高/低張性の変化（例えば溶質勾配）を含むハイブリダイゼーション環境により向上され得る。一実施形態では、装置内で溶質勾配を作る。装置の一例では、低塩濃度ハイブリダイゼーション溶液をアレイハイブリダイゼーションチャンバーの一方の側に入れ、それよりも高い塩濃度の緩衝液を他方の側に入れて、チャンバー内に溶質勾配を作る。

20

【0038】

定義

特に定義しない限り、本明細書中で使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解される意味を有する。本明細書に使用する場合、以下の用語は、特に明示しない限り与えられた意味を有する。

【0039】

「抗酸化剤」という用語は、水溶液中での蛍光色素（特に蛍光色素Cy5TM）などの第2の化合物の酸化を阻害または防止することが可能なあらゆる化合物を含む。従って、この用語はまた、抗フリーラジカル保護作用を示す全ての化合物を含む。抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーは以下に詳細に記載する。ハイブリダイゼーションの間に酸化を受けやすい化合物に対して任意の程度の保護効果を有する（すなわち、ハイブリダイゼーション手順の間に酸化されるCy5TM蛍光色素が少ない）場合に、ある化合物は、抗酸化剤またはフリーラジカル阻害剤として有効であると考えられる。

30

【0040】

本明細書で使用する「アリアル置換型4,4-ジフルオロ-4-ボラー3a,4a-ジアザ-s-インダセン色素」という用語は、全ての「ボロンジピロメテンジフルオリド蛍光色素（蛍光団）」すなわち「BODIPY」色素および「ジピロメテンボロンジフルオリド色素」（例えば米国特許第4,774,339号を参照）またはその等価物を含み、ハイブリダイゼーション反応において使用された場合に核酸の検出のために核酸を標識化するのに一般的に使用される蛍光色素のクラスである。例えばChen (2000) J. Org. Chem. 65:2900-2906; Chem (2000) J. Biochem. Biophys. Methods 42:137-151を参照。米国特許第6,060,324号；同第5,994,063号；同第5,614,386号；同第5,248,782号；同第5,227,487号；同第5,187,288号も参照のこと。

40

【0041】

「シアニン5」または「Cy5TM」および「シアニン3」または「Cy3TM」という

50

用語は、以下に詳細に記載する Amer sham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) (Amer sham Life Sciences, Arlington Heights, IL) 製の蛍光シアニン色素、またはその等価物を指す。米国特許第 6, 027, 709 号；同第 5, 714, 386 号；同第 5, 268, 486 号；同第 5, 151, 507 号；同第 5, 047, 519 号を参照。これらの色素は、典型的に、Cy 5TM または Cy 3TM に結合した 5-アミノ-プロパギル-2'-デオキシシチジン 5'-トリホスフェートの形式で核酸に取り込まれる。図 1 を参照のこと。

【0042】

本明細書で使用する「蛍光色素」という用語は、ローダミン色素（例えば、テトラメチルローダミン、ジベンゾローダミン、例えば米国特許第 6, 051, 719 号を参照）；フルオレセイン色素；「BODIPY」色素および等価物（例えばジピロメテンボロンジフルオリド色素、例えば米国特許第 5, 274, 113 号を参照）；1-[イソインドリル]メチレン-イソインドールの誘導体（例えば米国特許第 5, 433, 896 号を参照）；ならびに全ての等価物を含む、全ての公知の蛍光色素を含む。米国特許第 6, 028, 190 号；同第 5, 188, 934 号も参照のこと。

【0043】

本明細書で使用する「と特異的にハイブリダイズする」、「特異的なハイブリダイゼーション」および「と選択的にハイブリダイズする」という用語は、核酸分子が、ストリンジェントな条件下で、特定のヌクレオチド配列と優先的に結合、二重らせん化、またはハイブリダイズすることを指す。「ストリンジェントな条件」という用語は、プローブがその標的サブ配列に優先的にハイブリダイズし、他の配列には低い程度でまたは全くハイブリダイズしない条件を指す。核酸ハイブリダイゼーションの文脈（例えば、アレイ、サザンまたはノーザンハイブリダイゼーション）における「ストリンジェントな条件」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は、配列に依存的であり、異なる環境パラメータ下で異なる。本発明の範囲内の核酸を同定するために使用できるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、例えば、50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDSを含む緩衝液中で42℃でのハイブリダイゼーション、または5×SSC、および1%SDSを含む緩衝液中で65℃でのハイブリダイゼーション（両方とも0.2×SSCおよび0.1%SDSで65℃での洗浄を伴う）が挙げられる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、40%ホルムアミド、1M NaCl および1%SDSの緩衝液中で37℃でのハイブリダイゼーション、ならびに1×SSC中45℃での洗浄も挙げられる。あるいはまた、0.5 M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1 mM EDTA 中で65℃でのフィルタ結合 DNA へのハイブリダイゼーション、および0.1×SSC/0.1%SDS中で68℃での洗浄を使用して、本発明の範囲内の核酸を同定および単離できる。当業者であれば、代替的だが匹敵するハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を利用して、同様のストリンジェンシーの条件を得ることができ、これを容易に理解するであろう。しかし、ハイブリダイゼーション形式の選択は重大ではなく、当該分野において知られているように、核酸が本発明の範囲内にあるか否かを決定する条件を示すのは洗浄条件のストリンジェンシーである。本発明の範囲内にある核酸を同定するために使用する洗浄条件としては、例えば、約0.02モルで、pH 7の塩濃度、および少なくとも約50℃または約55℃～約60℃の温度；約0.15 M NaClの塩濃度で72℃にて約15分間；約0.2×SSCの塩濃度で少なくとも約50℃または約55℃～約60℃の温度で、約15～約20分間；ハイブリダイゼーション複合体を、0.1%SDSを含む約2×SSCの塩濃度の溶液で室温にて15分間2度洗浄し、その後、0.1%SDSを含む0.1×SSCで68℃にて15分間2度洗浄すること；または等価な条件が挙げられる。洗浄のためのストリンジェントな条件はまた、例えば、0.2×SSC/0.1%SDSで42℃であってもよい。核酸分子がデオキシオリゴヌクレオチド（「オリゴ」）である場合、ストリンジェントな条件は、6×SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウム中で37℃（14塩基オリゴ

10

20

30

40

50

の場合)、48℃(17塩基オリゴの場合)、55℃(20塩基オリゴの場合)、および60℃(23塩基オリゴの場合)での洗浄を含み得る。等価なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件の詳細な説明、ならびに試薬および緩衝液(例えばSSC緩衝液ならびに等価な試薬および条件)についてはSambrook, AusubelまたはTijssen(以下で引用)を参照のこと。

【0044】

本明細書で使用する「検出可能な組成物での標識(化)」または「検出可能な部分での標識(化)」という用語は、以下に詳細に記載するような検出可能な組成物(すなわち標識)を付加した核酸を指す。これには、例えばニックトランスレーション、ランダムプライマー伸長、変性プライマーを用いた増幅などによる核酸への標識化塩基(または検出可能な標識に結合可能な塩基)の取込みが挙げられる。標識は、例えば、可視的、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、物理的または化学的手段などの任意の手段により検出

10

【0045】

「ゲノムDNAの分子プロフィール」という用語は、DNAの対照(例えば、「正常」)サンプルと比べて、ゲノムDNAを表す核酸の被験サンプルにおける増幅、欠失および/またはユニークな配列の領域の検出を意味する。

【0046】

本明細書で使用する「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを指す。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。この用語はまた、合成骨格を有する核酸様構造も含む。本発明が提供するDNA骨格類似体としては、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファメート、3'-チオアセタール、メチレン(メチルイミノ)、3'-N-カルバメート、モルホリノカルバメート、およびペプチド核酸(PNA)が挙げられる; *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, F. Eckstein編, IRL Press at Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 600, BasergaおよびDenhardt編 (NYAS 1992); Milligan (1993) *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press)を参照。PNAは、N-(2-アミノエチル)グリシンユニットなどの非イオン性骨格を含む。ホスホロチオエート連結は、例えば、米国特許第6,031,092号;同第6,001,982号;同第5,684,148号に記載されている;WO 97/03211;WO 96/39154;Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197も参照のこと。この用語により包含される他の合成骨格としては、メチルホスホネート連結または代替的なメチルホスホネートおよびホスホジエステル連結(例えば、米国特許第5,962,674号;Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698を参照)、ならびにベンジルホスホネート連結(例えば、米国特許第5,532,226号;Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156を参照)を包含する。核酸という用語は、遺伝子、DNA、RNA、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドプライマー、プローブおよび増幅産物と互換的に用いる。

20

30

40

【0047】

本明細書で使用する「アレイ」、「マイクロアレイ」、「DNAアレイ」、「核酸アレイ」または「バイオチップ」という用語は、複数の標的エレメントであり、各標的エレメントは、以下に詳細に記載するようにサンプル核酸とのハイブリダイゼーションのために固相表面に固定化された所定の量の1つ以上の核酸分子、またはプローブ(以下に定義)を

50

含む。本明細書で使用する「プローブ」または「核酸プローブ」という用語は、標的核酸のサンプルとのハイブリダイゼーション（以下に定義）が検出され得る 1 つ以上の核酸断片（例えば固定化核酸、例えば核酸アレイ）の集合として定義される。

【0048】

本明細書で使用する「核酸標的のサンプル」または「核酸のサンプル」という用語は、他の核酸、ポリペプチドもしくはそれらの組合せ（例えば固定化プローブ）へのハイブリダイゼーションに適した形態の（例えば、可溶性水溶液としての）DNA もしくは RNA、または天然由来源から単離された DNA もしくは RNA を表す核酸を含むサンプルを指す。核酸は単離、クローニングまたは増幅されたものとしうる。例えば、実質的にゲノム全体、特定の染色体の実質的に全体もしくは一部、または選択された配列（例えば特定のプロモーター、遺伝子、増幅もしくは制限断片、cDNA など）から得るゲノム DNA、mRNA、もしくは cDNA であり得る。核酸サンプルは、特定の細胞または組織から抽出され得る。核酸サンプルが調製される細胞または組織サンプルは、典型的に、ゲノム核酸塩基置換、増幅、欠失および／または転座を伴う遺伝子欠陥または遺伝子関連病状もしくは状態（例えば、癌）を有すると疑われる患者から採取される。細胞および組織サンプルを単離する方法は、当業者に周知であり、吸引、組織切片、針生検などが挙げられるがこれらに限定されない。サンプルは、組織学的目的のために採られた冷凍切片またはパラフィン切片などの組織切片を含む、患者から得たサンプルである「臨床サンプル」であることが多い。サンプルは、細胞培養物由来の（細胞の）上清または細胞自体、染色体異常を検出するかもしくはアンプリコンのコピー数を決定することが望ましい組織培養物および他の培地由来の細胞からも誘導され得る。場合により、ハイブリダイゼーションの前に PCR などの標準的技術を用いて核酸は増幅され得る。代替的な実施形態では、標的核酸は、未標識であるかまたは（例えば本明細書に記載するように）標識化されて、プローブ（例えば、アレイに固定化されたオリゴヌクレオチドまたはクローン）への結合を検出できるようにしてもよい。プローブは、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅産物の集合、実質的に染色体全体もしくは染色体断片、または実質的にゲノム全体の 1 つ以上の特定（予め選択された）部分から得た核酸の供与源から生成され、該供与源を集合的に表し得る（例えばクローンの集合として、例えば BAC、PAC、YAC など（以下参照））。プローブまたはゲノム核酸サンプルは、なんらかの手法（例えば反復核酸のブロッキングもしくは除去、または選択核酸での富化）により処理されていてもよい。

【0049】

核酸の生成および操作

本発明は、核酸アレイを含む組成物、および核酸ハイブリダイゼーション反応を行う方法を提供する。本明細書に記載するように、分析のための標識化標的核酸、およびアレイ上の固定化核酸は、染色体の所定の部分もしくは全体、またはゲノム全体を含むゲノム DNA を表し得る。いくつかの実施形態では、本発明のアレイおよび方法は、アレイ上での比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）反応を含む比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）反応において使用される（例えば、米国特許第 5, 830, 645 号；同第 5, 976, 790 号を参照）。これらの反応は、被験サンプルと対照サンプルとの遺伝子組成を比較する。例えば、「陰性」対照（例えば「正常」野生型遺伝子型）または「陽性」対照（例えば公知の癌細胞もしくは公知の欠陥（例えば転座もしくは増幅など）を有する細胞）と比べて、（例えば遺伝子欠陥を有すると疑われる細胞から得た）ゲノム DNA の被験サンプルが、増幅、欠失または突然変異を有するセグメントを含むか否かを比較する。

【0050】

他の実施形態では、被験サンプルは、染色体もしくはゲノムの所定の部分、またはゲノム全体を表す核酸の断片を含む。被験サンプルは、例えば検出可能な部分（例えば蛍光色素）により標識化され得る。典型的に、被験サンプル核酸は蛍光色素で標識化され、対照（例えば「正常」）サンプルは第 2 の色素（例えば Cy 3TM および Cy 5TM）で標識化される。被験および対照サンプルを両方とも、（例えばアレイ上の）固定化プローブにア

ブライシ、ハイブリダイゼーションおよび洗浄後に、各色素の位置（例えばアレイ上のスポット）および量を読み取る。固定化核酸は、染色体またはゲノムの任意の部分または全体を表し得る。アレイに固定化される場合、この核酸は、本明細書に記載するようにクローンDNAの形態（例えばYAC、BAC、PACなど）であり得る。アレイ技術の典型として、アレイ上の各「スポット」は既知の配列（例えばゲノムまたは他の配列の既知のセグメント）を有している。本発明は、科学文献および特許文献に明確に記載されている当該分野で公知の任意の方法、プロトコルまたは装置で実施され得る。

【0051】

全般的技術

本発明を実施する際に使用する核酸は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、ベクター、ウイルスまたはそれらのハイブリッドに関わらず、様々な供与源から単離され、遺伝子操作され、増幅され、および／または組換え発現／組換え生成され得る。細菌細胞に加えて、例えば哺乳動物、酵母、昆虫または植物細胞発現系などを含む任意の組換え発現系を使用できる。

【0052】

あるいはまた、これらの核酸は、例えば、Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4, 458, 066号に記載されるような周知の化学合成技術により *in vitro* で合成されたものであってもよい。その後、相補鎖を合成して適切な条件下で鎖を互いにアニーリングするか、またはプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用いて相補鎖を付加させるかのいずれかにより二本鎖DNA断片を得てもよい。

【0053】

例えば、サブクローニング、プローブの標識化（例えば、クレノウポリメラーゼを用いたランダムプライマー標識化、ニックトランスレーション、増幅）、配列決定、ハイブリダイゼーションなどの核酸を操作するための技術は、科学文献および特許文献に明確に記載されている。例えば、Sambrook編、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (第2版), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel編 John Wiley and Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen編 Elsevier, N. Y. (1993) を参照のこと。

【0054】

本発明の組成物および方法において使用される核酸を得て、操作するための別の有用な手段は、ゲノムサンプルからクローニングすることであり、必要であれば、例えばゲノムクローン、cDNAクローンまたは完全ゲノムDNAの他の供与源から単離（または増幅）されたインサートをスクリーニングおよび再クローニングすることである。従って、本発明の方法および組成物において使用されるゲノム核酸の形態（アレイおよび枝分かれサンプルを含む）は、例えば哺乳動物人工染色体（例えば、Ascenzioni (1997) Cancer Lett. 118:135-142; 米国特許第5, 721, 118号; 50

同第6, 025, 155号を参照) (ヒト人工染色体を含む、例えば、Warburton (1997) Nature 386: 553-555; Roush (1997) Science 276: 38-39; Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15: 333-335を参照); 酵母人工染色体(YAC); 細菌人工染色体(BAC); P1人工染色体(例えば、Woon (1998) Genomics 50: 306-316; Boren (1996) Genome Res. 6: 1123-1130を参照); PAC (バクテリオファージP1由来ベクター、例えばIoannou (1994) Nature Genet. 6: 84-89; Reid (1997) Genomics 43: 366-375; Nothwang (1997) Genomics 41: 370-378; Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124を参照); コスミド、プラスミドもしくはcDNAに含まれるかそれから全体的に構成されるゲノムまたはcDNAライブラリーを含む。BACは、120 Kb以上のインサートを含むベクターである。BACは、大腸菌F因子プラスミド系に基づき、マイクログラムの量での操作および精製が簡単である。BACプラスミドは、細胞当たり1~2コピーに維持されているため、本方法でも採用され得るYACで見とめられる再配置の問題がなくなる; 例えば、Asakawa (1997) Gene 69-79; Cao (1999) Genome Res. 9: 763-774を参照。BACベクターは、例えばルシフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質遺伝子などのマーカー遺伝子を含んでもよい(例えば、Baker (1997) Nucleic Acids Res 25: 1950-1956を参照)。YACも使用でき、80~700 kbのサイズのわたるインサートを含むことができる(例えば、Tucker (1997) Gene 199: 25-30; Adam (1997) Plant J. 11: 1349-1358; Zeschneigk (1999) Nucleic Acids Res. 27: 21を参照)。P1は、75~100 KbのDNAインサートを含み得る大腸菌に感染するバクテリオファージであり(例えば、Mejia (1997) Genome Res 7: 179-186; Ioannou (1994) Nat Genet 6: 84-89を参照)、スライブラリーとほぼ同様にスクリーニングされる。Ashworth (1995) Analytical Biochem. 224: 564-571; Gingrich (1996) Genomics 32: 65-74も参照のこと。配列、インサート、クローン、ベクターなどは、ATCCもしくはGenBankライブラリーなどの供与源または市販の供与源から得られる天然由来源から単離され得るか、または合成もしくは組換え方法により調製される。

【0055】

核酸の増幅

オリゴヌクレオチドプライマーを用いた増幅を利用して、本発明の組成物および方法で使用する核酸を生成し、アレイにハイブリダイズした被験サンプルまたは対照サンプルのレベルを検出または測定できる。(典型的に変性プライマーを用いた)増幅も、検出可能なプローブ(例えば、Cy5TMまたはCy3TMシトシンコンジュゲート)を、固定化ゲノムDNAとハイブリダイズさせるのに使用する被験または対照ゲノムDNAを表す核酸に取り込むために有用である。当業者であれば、適切なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択および設計できる。増幅方法も当該分野で周知であり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、すなわちPCR (PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Innis編, Academic Press, N. Y. (1990) およびPCR STRATEGIES (1995), Innis編, Academic Press, Inc., N. Y., リガーゼ連鎖反応(LCR) (例えば、Wu (1989) Genomics 4: 560; Landegren (1988) Science 241: 1077; Barringer (1990) Gene 89: 117を参照); 転写増幅(例えば、Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173を参照); ならびに自己維持配列複製(例えば、Guatelli (1990) Proc. Natl

10

20

30

40

50

Acad. Sci. USA 87:1874を参照) ; Q β レプリカーゼ増幅 (例えば、Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491を参照)、自動化Q β レプリカーゼ増幅アッセイ (例えば、Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271を参照)、ならびに他のRNAポリメラーゼ仲介型技術 (例えば、NASBA, Cengage, Mississauga, Ontario) を参照; Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; 米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564も参照) が挙げられる。例えば、増幅プライマーにおけるポリアミド核酸誘導体 (PNA) の使用を記載する 10
米国特許第6,063,571号を参照のこと。

【0056】

核酸のハイブリダイゼーション

本発明の方法を実施し、本発明の組成物を使用する際に、核酸の被験および対照サンプルを、(例えばアレイ上の) 固定化プローブ核酸とハイブリダイズさせる。一実施形態では、ハイブリダイゼーション条件および/または洗浄条件は中程度からストリンジェントな条件下で実施される。核酸のハイブリダイゼーションについての広範囲にわたる手引きは、例えば、Sambrook、Ausubel、Tijssenで見つけることができる。一般的に、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は、所定のイオン強度およびpHにおける特定の配列の熱融解温度 (T_m) よりも約5℃低く 20
なるように選択される。 T_m は、50%の標的配列が完全に適合したプローブとハイブリダイズする (所定のイオン強度およびpH下での) 温度である。非常にストリンジェントな条件は、特定のプローブの T_m と等しくなるように選択される。サザンまたはノーザンブロットにおいてアレイまたはフィルタ上に100を上回る相補性残基を有する相補核酸のハイブリダイゼーションのためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、標準ハイブリダイゼーション溶液 (例えば、Sambrookを参照) を42℃で使用し、ハイブリダイゼーションを一晩かけて行うことである。高度にストリンジェントな洗浄条件の一例は、0.15 M NaClで72℃にて15分間である。ストリンジェントな洗浄条件の一例は、0.2 \times SSC洗浄を65℃で15分間行うことである (例えば、Sambrookを参照)。しばしば、高度にストリンジェントな洗浄は、バックグ 30
ラウンドプローブシグナルを無くすために中程度または低度にストリンジェントな洗浄の後に行われる。例えば100ヌクレオチドを上回る二重らせんのための中程度にストリンジェントな洗浄の一例は、1 \times SSCで45℃にて15分間である。例えば100ヌクレオチドを上回る二重らせんの低度にストリンジェントな洗浄の一例は、4 \times ~6 \times SSCで40℃にて15分間である。

【0057】

検出可能に標識された核酸

一部の実施形態では、本発明の方法および組成物は、検出可能な部分にコンジュゲートしたゲノムDNAを表すか、検出可能な部分 (例えばCy3TM またはCy5TM) (あるいはまた、それ自体が検出可能な組成物に結合可能な部分) にコンジュゲートしたヌクレ 40
オシド塩基が取り込まれている核酸を使用する。被験サンプルは、染色体の一部もしくはは全体、またはゲノム全体を表す核酸の標識化断片を含み得る。一実施形態では、被験サンプル核酸をある標識とコンジュゲートさせ、対照サンプルを第2の標識とコンジュゲートさせる。各標識は、区別されて (示差的に) 検出できる (例えば、異なるシグナルを発する)。被験および対照サンプルを両方とも、(例えばアレイ上の) 固定化プローブにアプライし、ハイブリダイゼーションおよび洗浄後に、各標識の位置 (例えば、アレイ上のスポット) および量を同時にまたは逐次読み取る。

【0058】

有用な標識としては、³²P、³⁵S、³H、¹⁴C、¹²⁵I、¹³¹I; 蛍光色素 (例えば、Cy5TM、Cy3TM、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体、テキサス 50

レッド)、高電子密度試薬(例えば、金)、例えばE L I S Aで一般的に使用されるような酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、比色標識(例えば、コロイド金)、磁気標識(例えば、D y n a b e a d sTM)、ビオチン、ジオキシゲニン(d i o x i g e n i n)、または抗血清もしくはモノクローナル抗体が入手可能なハプテンおよびタンパク質が挙げられる。標識は、検出対象の核酸もしくは他の標的化合物に直接取り込まれるか、または標的とハイブリダイズもしくは結合するプローブもしくは抗体に付加できる。ペプチドは、二次リポーター(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、転写アクチベーターポリペプチド、金属結合ドメイン、エピトープタグ)により認識される所定のポリペプチドエピトープを(例えば、ヌクレオシド塩基に)取り込むことにより検出可能にできる。標識は、様々な長さのスペーサーアームに付着されて、他の有用なまたは所望の特性に対する潜在的な立体障害または衝突を減少させることができる。例えば、M a n s f i e l d (1995) M o l C e l l P r o b e s 9:145-156を参照のこと。アレイ利用型C G Hでは、典型的に、蛍光体は互いに対合する(一方は標識化対照および他方は被験核酸)。例えば、ロードミンおよびフルオレセイン(例えば、D e R i s i (1996) N a t u r e G e n e t i c s 14:458-460を参照)、もしくはリサミン(l i s s a m i n e)コンジュゲート核酸類似体およびフルオレセインコンジュゲートヌクレオチド類似体(例えば、S h a l o n (1996) 前掲を参照); スペクトルレッド(S p e c t r u m R e d)TMおよびスペクトルグリーン(S p e c t r u m G r e e n)TM(V y s i s , D o w n e r s G r o v e , I L)、またはC y 3TMおよびC y 5TM(以下参照)。

【0059】

シアニンおよび関連する色素(メロシアニン、スチリルおよびオキソノル色素など)は、特に強力な光吸収性および高い発光性を有する(例えば、米国特許第4,337,063号;同第4,404,289号;同第6,048,982号を参照)。一実施形態では、C y 3TMおよびC y 5TMは共に使用され、両方ともA m e r s h a m L i f e S c i e n c e s (A r l i n g t o n H e i g h t s , I L)製の蛍光シアニン色素である。これらは、ゲノムDNAのサンプルの転写により(例えば、クレノウポリメラーゼを用いたランダムプライマー標識化、「ニックトランスレーション」、増幅、またはそれらの等価な手法により)、「標的」核酸に取り込まれ得る。ここで、これらの反応は、未標識化d C T Pと混合されたC y 3TM—またはC y 5TM—d C T Pコンジュゲートを取り込む。製造元の説明書に従い、P C Rにより標識化標的を生成する場合、33%改変d C T P対66%非改変d C T Pの混合物により標識の最大取り込みが達成される。改変d C T Pが50%以上を占める場合、P C R反応は阻害される。C y 5TMは、典型的に、H e N e レーザの633 nm線により励起され、発光は680 nmで採取される。例えば、B a r t o s i e w i c z (2000) A r c h i v e s o f B i o c h e m . B i o p h y s i c s 376:66-73; S c h e n a (1996) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 93:10614-10619; P i n k e l (1998) N a t u r e G e n e t i c s 20:207-211; P o l l a c k (1999) N a t u r e G e n e t i c s 23:41-46も参照のこと。

【0060】

蛍光色素で核酸を標識化する方法、および複数の蛍光団(f l u o r o p h o r e)を同時検出する方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,539,517号;同第6,049,380号;同第6,054,279号;同第6,055,325号を参照のこと。例えば、分光写真器は、光検出器の二次元アレイ上に発光スペクトルを画像化できる。従って、アレイの完全なスペクトル的に解像された画像が得られる。蛍光団の光物理(例えば蛍光量子収量および光破壊収量)、ならびに検出器の感度は、オリゴヌクレオチドアレイの読取り時間パラメータである。十分なレーザ出力光、ならびにより低い光破壊収量を有するC y 5TMおよび/またはC y 3TMを使用した場合、アレイは5秒未満で読み取ることができる。

【0061】

(例えばCGHにおけるように) Cy3TMおよびCy5TMなどの2つの蛍光体を一緒に使用する場合、両方の蛍光体の合成画像を作成する必要がある。2つの画像を得るために、アレイを同時にまたは逐次走査できる。電荷結合デバイスすなわちCCDが、マイクロアレイ走査システムにおいて一般的に使用される。

【0062】

データ分析は、例えば、基板位置の関数としての蛍光強度を決定するステップ、「孤立値」(所定の統計的分布から逸脱するデータ)を除去するステップ、または残ったデータから標的の相対結合親和性を計算するステップを含むことができる。得られるデータは、発光または標的とプローブとの結合親和性により異なる色を各領域につけて画像として表示され得る。例えば、米国特許第5,324,633号;同第5,863,504号;同第6,045,996号を参照のこと。本発明はまた、支持体上に位置するサンプル上の標識化マーカを検出するための装置を採用することができる。例えば、米国特許第5,578,832号を参照のこと。

【0063】

標識化ゲノム核酸の断片化および消化

本発明は、約200塩基未満から約25〜約30塩基程度に小さい標識化ゲノム断片を用いた方法および組成物を提供する。典型的なCGHプロトコールは、かなり大きい標識化核酸を使用する。実際、一部のプロトコールは、ハイブリダイゼーションの強度および一貫性を改善するために長い断片の使用を推奨している(例えば、Kallioniemi (1994) Genes, Chromosomes and Cancer 10:231-243を参照)。

【0064】

上述したように、標的標識化核酸のサイズが200塩基未満になると、ハイブリダイズしていない「ぶら下がり端部」のサイズが小さくなり、ハイブリダイズしていない端部が別のDNA断片にさらにハイブリダイズして「凝集ハイブリダイゼーション」を生じる確率も低くなる。アレイ利用型CGHなどのマイクロアレイハイブリダイゼーションの場合、この「凝集ハイブリダイゼーション」は、ハイブリダイゼーションの定量性を低くするだけでなく、高いバックグラウンドの原因となる。従って、本発明の組成物および方法は、断片化DNAプローブを約200塩基未満から約30塩基程度に小さい範囲のサイズとする。

【0065】

典型的に、ハイブリダイゼーション手順において使用される標識化核酸は、標準「ランダムプライミング」、「ニックトランスレーション」または変性PCR増幅によりゲノムDNAから作成される(例えば、Sambrook, Ausubel; Speicher (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1907-1914を参照)。しかし、得られる断片は、平均すると約200〜400塩基以上である(例えば、ニックトランスレーションによりビオチンで標識された総ゲノムDNAが400〜2000塩基のサイズの断片を生成する。Heiskanen (2000) Cancer Res. 60:799-802を参照)。断片の長さは、ニックトランスレーション反応においてDNase対DNAポリメラーゼの比率を調節することにより変えられる。標準的なニックトランスレーションキットは典型的に300〜600塩基対の断片を生成する(例えば、Kallioniemi (1994) 前掲を参照)。

【0066】

標識化核酸を200塩基以下(約25〜30塩基程度の小ささ)のセグメントにさらに断片化するために、例えばDNAエンドヌクレオアーゼ、例えばDNase(例えばHerrera (1994) J. Mol. Biol. 236:405-411; Suck (1994) J. Mol. Recognit. 7:65-70を参照)、または二塩基制限エンドヌクレオアーゼCviJI(例えば、Fitzgerald (1992) Nucleic Acids Res. 20:3753-3762を参照)および標準的ブ

10

20

30

40

50

ロトコール（例えば、他の断片化手順を伴うかまたは伴わない S a m b r o o k , A u s u b e l を参照）を用いて DNA のランダム酵素消化を行う。

【0067】

ゲノム DNA を断片化するために、例えば、機械的剪断、超音波処理（例えば D e i n i n g e r (1983) A n a l . B i o c h e m . 129:216-223 を参照）など（例えば S a m b r o o k , A u s u b e l , T i j s s e n を参照）の他の手順も使用できる。例えば、1つの機械的技術は、DNA サンプルをシリンジポンプで小さい穴に強引に通した際に生じるポイント・シンク（point-sink）流体力学に基づく（例えば、T h o r s t e n s o n (1998) G e n o m e R e s . 8:848-855 を参照のこと）。また、O e f n e r (1996) N u c l e i c A c i d s R e s . 24:3879-3886 ; O r d a h l (1976) N u c l e i c A c i d s R e s . 3:2985-2999 も参照のこと。断片のサイズは、例えば、キャピラリー電気泳動において動的サイズふるい（size-sieving）ポリマー溶液を用いて DNA 断片化を分析する S i l e s (1997) J . C h r o m a t o g r . A . 771:319-329 によるものののようなサイジング（sizing）電気泳動、を含む様々な技術により評価できる。断片のサイズは、例えばマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析によっても決定できる（例えば、C h i u (2000) N u c l e i c A c i d s R e s . 28:E31 を参照のこと）。

【0068】

抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャー

本発明は、多くのものが当該分野で知られている抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーを含む方法および組成物を提供する。例えば、一実施形態では、抗酸化剤は、メルカプト含有化合物またはその等価物、例えば、2-メルカプトエチルアミン、チオール N-アセチルシステイン、オボチオール、4-メルカプトイミダゾールなどを含み得る。アスコルビン酸（ビタミン C）もしくはトコフェロール（ビタミン E）などのビタミン含有化合物、またはその等価物も使用できる。トコフェロールは、例えば、 α -D-トコフェロール、 α -DL-トコフェロール、 α -D-酢酸トコフェロール、 α -DL-酢酸トコフェロール、または α -D-コハク酸トコフェロール（tocopherol acid succinate）などの改変形態および誘導形態を含むことができる（例えば、米国特許第 6,048,891 号；同第 6,048,988 号；同第 6,056,897 号を参照）。別の実施形態では、抗酸化剤は、n-没食子酸プロピルなどの没食子酸プロピル、またはその等価物を含む。 β カロチンもしくはその等価物、またはブチルヒドロキシトルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、もしくはその等価物も使用できる。

【0069】

ペプチドおよびペプチド誘導体もまた抗酸化活性を有することが記載されている。例えば、ラクトフェリンの加水分解物の抗酸化活性を記載する米国特許第 5,804,555 号を参照のこと。2-メルカプトイミダゾールまたは 4-メルカプトヒスチジン誘導体もまた抗酸化活性を有することが記載されている。例えば、それぞれ米国特許第 6,056,965 号および米国特許第 4,898,878 号を参照のこと。一部の環状ヒドロキシルアミンは、酸素中心フリーラジカルを捕捉（scavenging）するために有用である。例えば、米国特許第 5,981,548 号を参照のこと。アスコルビン酸 6-パルミテート、ジヒドロリポ酸もまた抗酸化剤として記載されている。例えば、米国特許第 5,637,315 号を参照のこと。米国特許第 5,162,366 号も参照のこと。

【0070】

CGH およびアレイに使用されるハイブリダイゼーションおよび洗浄溶液は、当該分野で公知である。例えば、C h e u n g (1999) N a t u r e G e n e t i c s S u p p . 21:15-19 を参照；上記定義の説明も参照のこと。これらの溶液中の抗酸化剤の濃度は、様々な要因（例えば、ハイブリダイゼーションまたは洗浄緩衝液の組成；酸化から「保護」される組成物（例えば C y 5TM）の濃度、ハイブリダイゼーションお

10

20

30

40

50

よび洗浄条件（例えば、時間の長さ、熱、温度など）に依存する。従って、様々な実施形態では、ハイブリダイゼーション、洗浄または他の溶液中の抗酸化剤の量は、例えば、約 25 mM～約 1 M、約 50 mM～約 750 mM、約 50 mM～約 500 mM、ならびに約 100 mM～約 500 mM の濃度であり得る。しかし、あらゆる適切な濃度の抗酸化剤またはフリーラジカルスカベンジャーを本発明を実施するために使用できる。

【0071】

追加の有効な抗酸化剤およびフリーラジカルは容易に決定できる。例えば、薬剤開発の中間成形 (preformulation) 期における抗酸化剤の高速スクリーニングのための簡単な方法の開発が、例えば U g w u (1999) P D A J. P h a r m. S c i. T e c h n o l. 53:252-259 に記載されている。抗酸化剤の存在下および不在下での溶解酸素欠乏および薬剤消滅速度の同時測定により、テトラヒドロイソキノリン核を含有する酸化し易い薬剤物質を使用して、相対的な抗酸化能を決定できる。例えば、Methods Enzymol. 1990; 186:1-766; 米国特許第 6,031,008 号も参照のこと。

【0072】

アレイ、または「バイオチップ」

本発明は、「アレイ」、「マイクロアレイ」、「DNA アレイ」、「核酸アレイ」または「バイオチップ」（例えば、Gene Chips (登録商標), Affymetrix, Santa Clara, CA) の改良型変形形態を提供する。本発明のアレイは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄反応の間の温度および湿度を制御するためのコンポーネントを含むハウジングを含む。

【0073】

アレイは、一般的に、サンプル核酸とのハイブリダイゼーションのために固相表面に固定化された所定の量の 1 つ以上の核酸分子またはプローブをそれぞれ含む複数の標的エレメントである。固定化核酸は、特異的なメッセージ（例えば、cDNA ライブラリーとして）または遺伝子（例えば、ゲノムライブラリー）から得た配列を含むことができ、例えば、染色体の実質的に全体もしくは一部、またはヒトゲノムを含むゲノムの実質的に全体を含む。他の標的エレメントは、参照配列などを含み得る。アレイの標的エレメントは、異なるサイズおよび異なる密度で固相表面上に配置され得る。標的エレメントの密度は、標識の性質、固相支持体などの多数の要素に依存する。各標的エレメントは、実質的に同じ核酸配列、または異なる長さおよび／もしくは配列の核酸の混合物を含み得る。従って、例えば、標的エレメントは 1 コピー以上の DNA クローン断片を含んで、それぞれのコピーは本明細書に記載するように異なる長さの断片に切断され得る。標的エレメントに固定化された核酸の長さおよび複雑度は、本発明にとって重要ではない。アレイは、固相表面（例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、溶融シリカ、プラスチックなど）に固定化された核酸を含み得る。例えば、蛍光を測定する場合にシクロオレフィンポリマーを含むマルチウェルプラットフォームを記載する米国特許第 6,063,338 号を参照のこと。一部の実施形態では、本発明の方法は、例えば、米国特許第 6,045,996 号；同第 6,022,963 号；同第 6,013,440 号；同第 5,959,098 号；同第 5,856,174 号；同第 5,770,456 号；同第 5,556,752 号；同第 5,143,854 号に記載されるように、核酸のアレイ上で実施できる。例えば、WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958 も参照のこと；例えば、Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes and Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Suppl. 21:25-32; Epstein (2000) Current Opinion in Biotech. 11:36-41 も参照のこと。

10

20

30

40

50

【0074】

ハイブリダイゼーションの間の湿度および温度の制御

本発明は、ハイブリダイゼーション条件が、制御されたハイブリダイゼーション環境、特に不飽和湿度環境を含む、方法および組成物を提供する。制御された環境の湿度および温度は、ハイブリダイゼーションステップの間、一定でもよいし、または周期的に変化させてもよい。変化は段階的な変化でも、徐々に変化であってもよい。代替的な実施形態では、不飽和湿度環境は、約90%の湿度、約80%の湿度、約70%の湿度、約60%の湿度、約50%の湿度、約40%の湿度、約30%の湿度、および約20%の湿度に制御される。代替的な実施形態では、湿度および／または温度を、約3時間間隔、約2時間間隔、約1時間間隔、約30分間隔、約15分間隔、約5分間隔、またはそれらの組合せで周期的に変化させる。

10

【0075】

本発明はまた、湿度および／または温度が制御されたハウジング中の固定化プローブ核酸のアレイを提供する。一実施形態では、このハウジングは、ハイブリダイゼーションの間のハウジング中の湿度および／または温度の量を測定および制御するためのコンポーネントを含む。例えば、本発明の装置は、例えば温度を制御するためのペルチェ熱伝達装置を含む熱制御モジュール（これらはハウジングに組み込まれ得る）などの当該分野で公知の任意の温度検出または制御コンポーネントを含み得る。例えば、このような装置を電気泳動媒体において使用する米国特許第6,017,434号を参照のこと。あるいはまた、本発明の装置は、流体を導入し易いサーモスタット制御された密封チャンバー（例えば、米国特許第5,945,334号を参照）；液体の温度調節操作のためのシステム（例えば、米国特許第5,919,622号を参照）；流体密封式に高温反応を行うための反応チャンバー（例えば、米国特許第5,882,903号を参照）；流体操作装置を有する生物学的チッププレート（例えば、米国特許第5,874,219号を参照）；または温度制御装置式の反応容器（例えば、米国特許第5,460,780号を参照）を含み得る。本発明の装置はまた、任意の湿度もしくは水蒸気を検出もしくは制御するためのコンポーネント、またはそれらの適合もしくは改変形態も含み得る。このような装置の多くは当該分野において公知である（例えば、ガラス表面上の水分状態を検出するための装置を記載する米国特許第4,436,674号；同第4,618,462号；同第4,921,642号；同第5,620,503号；同第5,806,762号；および同第6,064,059号）。

20

30

【0076】

コンポーネントは、湿度、温度および他の環境パラメータを含むハイブリダイゼーション条件を予めプログラム化することが可能なメモリコンポーネントを含むことができる。

【0077】

本明細書に記載する実施例および実施形態は、例示のみを目的としたものであり、それらを考慮した上での様々な改変または変更が当業者に示唆され、本明細書の精神および範囲、ならびに特許請求の範囲に含まれることが理解されよう。

【0078】

実施例

以下の実施例は、特許請求する発明を例示するためのものであり、限定するものではない。

40

【0079】

実施例1：アレイ利用型核酸ハイブリダイゼーション

以下の実施例は、本発明の方法が、アレイ利用型CGHを実施するための改良された効率的な手段を提供することを実証する。

【0080】

BACマイクロアレイの作製：

50キロベース（50 kb）を上回り、約300 kbにおよぶBACクローンを、Tet r r i f i c プロス培地中で成長させた（例えばクローンが300 kbを上回るより大

50

きいインサート、または約1～20 kbのより小さいインサートも使用できる)。改変アルカリ溶解 (l y s i s) プロトコール (例えば、S a m b r o o kを参照) によりDNAを調製した。米国特許第6, 048, 695号に記載のように、DNAを化学的に修飾した。次いで、米国特許第6, 048, 695号に記載されるように、修飾DNAを適切な緩衝液に溶解し、きれいなガラス表面上に直接印刷した。通常、各クローンに対して複数のスポットを印刷した。図2は、これらの調査において使用した不均衡な湿度ハイブリダイゼーション形式の模式図である。

【0081】

プローブ標識化およびDNase酵素断片化:

標準的なランダムプライミング方法を使用して、ゲノムDNAを標識化した (例えば、S a m b r o o kを参照)。Cy 3TM またはCy 5TM 標識化ヌクレオチドに共に、対応する標識していないヌクレオチドを0. 0対約6 (標識していないヌクレオチド対標識化ヌクレオチド) のモル比で添加した。標識化は、37℃にて2～10時間かけて行った。標識化の後、反応混合物を95℃～100℃まで3～5分間加熱して、ポリメラーゼを不活化し、鋳型から新しく生成された標識化「プローブ」核酸を変性させた。

【0082】

次いで、加熱サンプルを氷上で5分間冷やした。「校正された」DNase (DNAエンドヌクレアーゼ) 酵素を加えて、(ランダムプライミングにより作製された) 標識化鋳型を断片化した。「微量 (t r a c e)」のDNaseを添加して (最終濃度は0. 2～2 ng/ml; インキュベーション時間は15～30分間)、標識化核酸を約30～約100塩基のサイズのセグメントに消化/断片化した。

【0083】

C o t I DNAを使用した反復配列のブロックング

C o t I DNAを、約40～150塩基のサイズに断片化した。2～20 μgの断片化C o t I DNAを、10～30 μgの剪断サケ精子もしくは精巣DNA (約0. 1～2 kbのサイズ) (担体DNA、他の無関係のDNAでもよい) と共に、0. 2%～10%塩基ハイブリダイゼーション緩衝液を含む2×～6 S S P Eに溶解させた (例えば、S a m b r o o kを参照)。混合物をアレイ領域にアプライし、その後カバースライドで覆った。アレイを、60℃にて2～16時間、加湿チャンバーに入れた。

【0084】

標識化プローブとアレイとのハイブリダイゼーション

(ヒトおよびマウスゲノムDNAの両方から誘導された) それぞれ10, 000～1, 000, 000ゲノム当量の2つのゲノム断片を、上述したようにCy 3TM またはCy 5TM 蛍光標識のいずれかをを用いてそれぞれ標識化した。その後、これらを約2～20 μgのC o t Iおよび約10～30 μgの担持されたDNAまたは約50～100 μgの酵母tRNAと同時に沈降させた。混合物を、10～20 μlの塩基性ハイブリダイゼーション緩衝液に溶解させた (上記参照)。

【0085】

ハイブリダイゼーション緩衝液に添加する抗酸化剤

抗酸化剤ジチオトレイトール (D T T) を、10～500 mMの濃度で添加して、蛍光色素を安定化させた。他の有用な抗酸化剤としては、例えば、n-没食子酸プロピル、アスコルビン酸 (ビタミンC)、ビタミンE (トコフェロール)、2-メルカプトエチルアミン、または上述したような他のメルカプト含有化合物が挙げられる。混合物をアレイ領域にアプライして、その後カバースライドで覆った (図2を参照)。炉中約90～95%の平均温度で約±3℃の温度変動で60℃にて一晚加湿チャンバーにおいてハイブリダイゼーションを行った (温度変化自体が密封チャンバー中の湿度に変動を生じ得る)。

【0086】

温度状態の変動

実験はまた、不均衡湿度環境が、可溶性標識化核酸と固定化プローブとの間の平衡状態に達するのに必要な時間を有意に短くしたことを実証した。これらの実験において使用する

10

20

30

40

50

装置の模式図を図2に示す。（「動的」温度状態を得るための）「未密封」カバースライドおよび（制御100%温度環境を得るための）密封カバースライドの両方を使用した。

【0087】

カバースライドを封止して、水蒸気の交換（すなわち動的温度環境）を防いだ場合、ハイブリダイゼーションの速度は有意に悪かった（平衡状態に達するのに有意に長い時間が必要であった）。アレイ上の固定化プローブにハイブリダイズしたCy3TMまたはCy5TM—生成蛍光の量（すなわち、標識化核酸の量）を測定することにより、ハイブリダイゼーションの速度を決定した。蛍光は、上述したように標準的な装置を用いて測定した。

【0088】

ハイブリダイゼーション後洗浄

カバースライドを取った後に、アレイを高純度水で数回濯いだ。次いで、0.1~2×SSCを0.1~1%SDSおよび5~10mM DTT抗酸化剤と共に含む溶液中で、アレイを30~60秒間洗浄した。次いで、アレイを高純度水で室温（RT）にて十分に濯いだ。

【0089】

画像取得およびデータ処理：

マイクロアレイ上の蛍光シグナルを走査して画像ファイルを得た（GSILumonic s（Oxnard, CA）から出ている二色レーザ共焦点スキャナ）。それぞれのアレイにつき、（Cy3TMおよびCy5TMについて）2枚の画像を取得した。プローブ混合物中での標的配列の相対量を表す相対蛍光レベルまたは蛍光比を、バックグラウンドを適切に引いた後に対応する個々のスポットの蛍光強度を比較することで分析した。アレイ上のクローンの位置情報および染色体を相関させた。簡単に見分けるように個々の染色体について比をプロットした。各サンプルにつき2つの実験を行った：（腫瘍DNAから誘導した）Cy5TM標識化核酸、対、（「正常」DNAから誘導した）Cy3TM標識化核酸、および（腫瘍DNAから誘導した）Cy3TM標識化核酸、対、（正常DNAから誘導した）Cy5TM標識化核酸。従って、個々の染色体についてCy5TM対Cy3TM比を共にプロットした場合、2本の比率曲線は互いに対して相互関係を示した。2つの相互実験を行うことで、あらゆる比率の人為産物も簡単に同定できる。

【0090】

結果：

上記調査では、抗酸化剤を使用しないハイブリダイゼーション反応に比べて、抗酸化剤ジチオトレイトール（DTT）をハイブリダイゼーション緩衝液に添加した場合に、蛍光シグナルが有意に強いことが分かった。さらに、酸化に対する「保護」の程度（すなわち、蛍光色素Cy5TMの安定化）は、抗酸化剤の濃度が高まるにつれて（10mMから500mM）高まった。例えば、12時間のハイブリダイゼーションの後、DTTを使用した場合、Cy5TMシグナルは一定のままであった。48時間のハイブリダイゼーションの後、対照（抗酸化剤無し）サンプルは、Cy5TMシグナルの有意な低下を示した（すなわち、シグナルが検出されない非蛍光状態になる程度のCy5TMが酸化した）。対照的にDTT含有サンプルは、比較的一定のままであり、一部のサンプルでは、Cy5TM蛍光が実際に高まった。

【0091】

上記調査においては、ハイブリダイゼーションの間の「不均衡な」または「動的に変化する」温度および／または温度環境が、可溶性標識化核酸と固定化プローブ核酸との間の平衡状態に達するまでに必要な時間を有意に短くすることも分かった。

【0092】

アレイハイブリダイゼーションチャンバー中の温度が、チャンバー全体でハイブリダイゼーション緩衝液と同じ濃度を有した場合には、温度はチャンバー全体で比較的一定のままであった。「動的」温度条件下（すなわち、例えば図2に図示するように作られた環境のように不均衡温度環境につながる環境）よりも、これらの一定の条件下では（可溶性核酸と固定化プローブとの間の）平衡状態に達するのにより長い時間が必要であった。この装

10

20

30

40

50

置では、アレイハイブリダイゼーションチャンバーの一方の側に水を入れ、2×ハイブリダイゼーション緩衝液を他方の側に入れた。水を一方の側、2×緩衝液を他方の側に入れることで、温度勾配をチャンバー内に作った。これにより、カバースライドの4つの端部の周りに温度の交換が生じ、これは、アレイハイブリダイゼーションチャンバーの温度を不均衡にした。図2に示す反応チャンバーも不完全に密封して（すなわち、「ゆるく」しか密封せずに）外部環境との温度の交換を可能にした。

【0093】

本発明は、特定の作用メカニズムに限定されるものではないが、動的湿度（および同様に、動的湿度）状態により、可溶性標識化核酸の自己会合の量が低くなった。このような自己会合は、アレイ上の固定化プローブとのハイブリダイゼーション速度を低下させる。可溶性核酸の自己会合が少なければ、固定化プローブとの会合速度が加速して、平衡状態に達するのに必要な時間が短くなる。

【0094】

不均衡湿度または温度はまた、可溶性サンプルの動きを高めて、ハイブリダイゼーション処理を加速させ得る。不変化湿度（または温度）環境の場合のように、溶液が比較的静的な場合、物質伝達プロセスは非常に遅い拡散メカニズムに限定される。ゆっくりかつ静的な条件下では、有意な量の可溶性核酸断片が、固定化アレイ標的部位と会合およびハイブリダイズする機会を持つ前に、他の可溶性核酸と会合する。

【0095】

ハイブリダイゼーション効率（すなわち、平衡状態になるまでの時間）も、高／低張性を変化させること（例えば、溶質勾配）を含むハイブリダイゼーション環境により向上できる。従って、装置の代替的な実施形態では、溶質勾配を作り、別の実施形態では、ハイブリダイゼーション反応全体でこれを維持できる。一例の装置では、低塩濃度ハイブリダイゼーション溶液をアレイハイブリダイゼーションチャンバーの一方の側に入れ、高塩濃度緩衝液（例えば、2×ハイブリダイゼーション緩衝液）を他方の側に入れて、チャンバー内に溶質勾配を作ることができる。

【0096】

（例えば炉または温度変化を作ることができる他の装置などで）反応チャンバー温度を変動的に変化させた場合に、ハイブリダイゼーション効率（すなわち、平衡状態になるまでの速度）も、制御された一定温度環境を用いて見とめられる速度と比べて大幅に向上した（向上させるための温度変化は、ほとんどの実験用炉に典型的な約+/-3℃の変化を上回る）。

【0097】

本発明のいくつかの実施形態を記載した。それでもなお、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な改変が行い得ることが理解されるであろう。従って、他の実施形態もまた特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本明細書に詳細に記載するCy5TMまたはCy3TMに結合した5-アミノ-プロパギル-2'-デオキシシチジン5'-トリホスフェートの模式図である。

【図2】

本明細書の実施例1に詳細に記載する不均衡温度ハイブリダイゼーション形式の模式図である。

各種図面において同じ参照符号は同様の構成要素を指す。

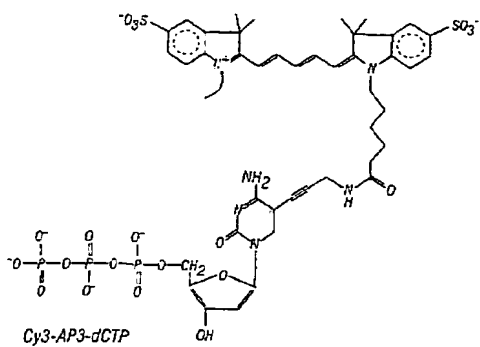
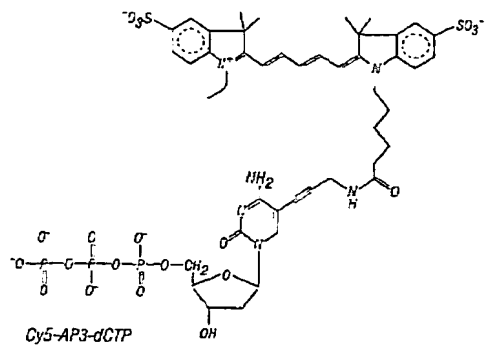
10

20

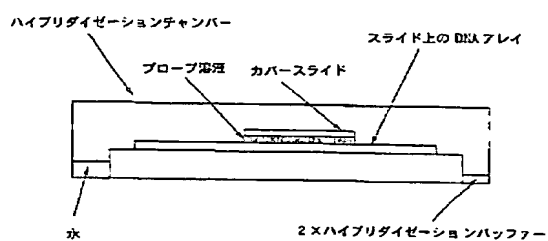
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 December 2001 (13.12.2001)

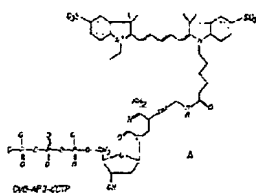
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/94630 A2

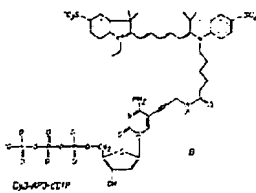
- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
(71) Inventor(s): and
(72) Inventor(s)/Applicant(s) (for IP rights): BRADLEY, Allan
(GB/US) 5127 Crossroads, Houston, TX 77056 (US);
CAL, Wils. Wes. (US/US); 2350 Hwy. 142, Houston,
TX 77056 (US).
- (74) Agent: EINHORN, Gregory, P. Fox & Richardson P.C.,
Suite 500, 4350 La Jolla Village Drive, San Diego, CA
92122 (US).
- (52) International Application Number: PCT/US01/15153
(73) International Filing Date: 19 April 2001 (19.04.2001)
- (53) Filing Language: English
(74) Publication Language: English
- (54) Priority Data: 60/210,153 7 June 2000 (07.06.2000) US
(55) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application: 60/210,153 (17 June 2000) (07.06.2000) US
(56) Applicant (for all designated States except US): BAYLOR
COLLEGE OF MEDICINE (US/US), Suite 106A, One
Baylor Plaza, Houston, TX 77030 (US).
- (57) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AN, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GR, GU, HK,
HU, IL, IN, IS, JP, KR, KZ, LG, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ,
PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UG, UA, UK, US, VN, YU, ZA, ZW.
- (58) Designated States (regional): ARIPO patent (SM, GM,
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM); European
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM);

(Continued on next page)

(54) Title: NOVEL COMPOSITIONS AND METHODS FOR ARRAY-BASED NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION



(57) Abstract: The invention provides compositions and methods for generating a molecular profile of genomic DNA by hybridization of labeled nucleic acid representing the genomic DNA to immobilized nucleic acid probes, e.g., arrays or beads.



WO 01/94630 A2

WO 01/94630 A2



patent (AZ, BE, CH, CY, DE, DK, EA, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CS, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, see the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

WO 01/44639

PC77US01/2833

NOVEL COMPOSITIONS AND METHODS FOR ARRAY-BASED NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION

STATEMENT AS TO FEDERALLY SPONSORED RESEARCH

This invention was made with Government support under a grant from National Institutes of Health, No. R21 CA83211. The Government may have certain rights in this invention.

5

TECHNICAL FIELD

This invention relates to molecular biology, genetic diagnostics and nucleic acid array, or "biochip," technology. In particular, the invention provides novel methods and compositions for array-based nucleic acid hybridizations.

BACKGROUND

10 Genomic DNA microarray based comparative genomic hybridization (CGH) has the potential to solve many of the limitations of traditional CGH method, which relies on comparative hybridization on individual metaphase chromosomes. In metaphase CGH, multi-megabase fragments of different samples of genomic DNA (e.g., known normal versus test, e.g., a possible tumor) are labeled and hybridized to a
16 fixed chromosome (see, e.g., Breen (1999) J. Med. Genetics 36:511-517; Rice (2000) Pediatric Hematol. Oncol. 17:141-147). Signal differences between known and test samples are detected and measured. In this way, missing, amplified, or unique sequences in the test sample, as compared to "normal," can be detected by the fluorescence ratio of normal control to test genomic DNA. In metaphase CGH, the
20 target sites (on the fixed chromosome) are saturated by an excess amount of soluble, labeled genomic DNA.

In contrast to metaphase CGH, where the immobilized genomic DNA is a metaphase spread, in array-based CGH method the immobilized nucleic acids are arranged as an array, on, e.g., a biochip or a microarray platform. Another difference
26 is that in array-based CGH the immobilized genomic DNA is in molar excess as compared to the copy number of labeled (test and control) genomic nucleic acid. Under such conditions, suppression of repetitive genomic sequences and cross

WO 01/46430

PCT/US01/12839

hybridization on the immobilized DNA is very helpful for reliable detection and quantitation of copy number differences between normal control and test samples. However, when traditional protocols are used such suppression is less than optimal. Furthermore, genomic DNA is a promiscuous mix containing more than 30% repetitive sequences and a further unknown proportion of closely related sequences. These sequences can cross-hybridize when traditional protocols are used to prepare test and sample DNA for hybridization to the array.

SUMMARY

The invention provides a method for generating a molecular profile of genomic DNA by hybridization of a genomic DNA target to an immobilized nucleic acid probe, comprising the following steps: (a) providing a plurality of nucleic acid probes comprising a plurality of immobilized nucleic acid segments; (b) providing a sample of target nucleic acid comprising fragments of genomic nucleic acid labeled with a detectable moiety, wherein each labeled fragment consists of a length smaller than about 200 bases; and (c) contacting the genomic nucleic acid of step (b) with the immobilized probes of step (a) under conditions allowing hybridization of the target nucleic acid to the probe nucleic acid.

In alternative embodiments, each labeled fragment consists of a length no more than about 175 bases; 150 bases; about 125 bases; about 100 bases; about 75 bases; about 50 bases; about 40 bases; about 30 bases; and about 25 bases. In another embodiment, each labeled fragment consists of a length between about 25 to about 30 bases and about 100 bases. These samples of target genomic nucleic acid can be prepared using a procedure comprising random priming, nick translation or amplification of a sample of genomic nucleic acid to generate segments of target genomic nucleic acid followed by a step comprising fragmentation or enzymatic digestion of the segments to generate a sample of target genomic nucleic acid consisting of sizes smaller than about 200 bases. In other embodiments, the sample of target genomic nucleic acid is further prepared, e.g., fragmented, using procedures comprising mechanical fragmentation, e.g., shearing, or, enzymatic digestion, e.g., DNase enzymes, or equivalent, digestion, of a genomic nucleic acid (including the labeled nucleic acid generated by nick translation, random priming or amplification).

WO 01/44630

PC/TUSOL/2038

to sizes smaller than about 200 bases, or, smaller than fragments of about 175 bases; about 150 bases; about 125 bases; about 100 bases; about 75 bases; about 50 bases; about 40 bases; about 30 bases; or about 25 bases. In another embodiment, the sample of target genomic nucleic acid (including the labeled target nucleic acid generated by nick translation, random priming or amplification) is prepared using a procedure comprising fragmentation of a genomic DNA to sizes smaller than about 200 bases by applying shearing forces sufficient to fragment genomic DNA followed by DNase or equivalent enzyme digestion of the sheared DNA to sizes smaller than about 200 bases, or, smaller than fragments of about 150 bases; about 125 bases; about 100 bases; about 75 bases; about 50 bases; about 40 bases; about 30 bases; or about 25 bases.

In this method, the conditions allowing hybridization of the target nucleic acid to the probe nucleic acid can comprise stringent hybridization conditions, or, alternatively, can also comprise stringent wash conditions. In alternative embodiments the stringent hybridization conditions can comprise a temperature of about 55°C to about 60°C to about 65°C. In other embodiments, the temperature of hybridization is changed at least once (or, many times) during the hybridization step. Also as described, below, the amount of humidity (i.e., water vapor) under which hybridization is performed can be modified at least once, or several times, during the hybridization step. The changes in temperature and/or humidity can be stepwise, or, gradual. The changes can continue throughout the hybridization procedure, or, any part of the hybridization step.

In one embodiment, the random priming, nick translation or amplification (using, e.g., degenerate primers) of the sample of genomic nucleic acid is used to generate segments of target genomic nucleic acid that incorporate detectably labeled base pairs into the segments. Alternatively, the incorporated base pairs can be modified or synthetic analog base pairs to allow attachment of detectable moieties to the base pairs. In one embodiment, the detectable label comprises a fluorescent dye, such as Cy3TM or Cy5TM, or equivalent, a rhodamine, a fluorescein or an aryl-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene dye or equivalents.

In one embodiment, the target nucleic acid consists essentially of DNA derived from a human. The sample of target genomic nucleic acid can comprise

WU 01/14630

PCT/US01/12838

sequences representing a defined fragment of a chromosome or substantially one or more entire chromosomes. The sample of target genomic nucleic acid can comprise sequences representing substantially an entire genome. In an alternative embodiment, the DNA from which the target or the probe nucleic acid is derived from a mammal, such as a mouse or a human genome.

The invention also provides a composition comprising a sample of target nucleic acid comprising fragments of genomic nucleic acid labeled with at least one detectable moiety, wherein each labeled fragment consists of a length smaller than about 200 bases, and the sample of labeled target genomic nucleic acid comprises sequences representing substantially a complete chromosome, or, substantially a complete genome. In alternative embodiments, the target genomic nucleic acid is smaller than about 175 bases; about 150 bases; about 125 bases; about 100 bases; about 75 bases; about 50 bases; about 40 bases; about 30 bases; or about 25 bases. In another embodiment, each labeled fragment consists of a length between about 30 bases and about 150 bases. In one embodiment, the target nucleic acid of the composition consists essentially of DNA derived from a human. The sample of target genomic nucleic acid can comprise sequences representing a defined fragment of a chromosome or substantially one or more entire chromosomes. The sample of target genomic nucleic acid can comprise sequences representing substantially an entire genome. In an alternative embodiment, the genome comprises a mammalian genome, such as a mouse or a human genome. In alternative embodiments, the composition can comprise any detectable label, e.g., it can comprises Cy3TM or Cy5TM.

The invention also provides kits comprising a sample of target nucleic acid and printed matter, wherein the target nucleic acid comprises fragments of genomic nucleic acid labeled with a detectable moiety, wherein each labeled fragment consists of a length smaller than about 200 bases and the sample of labeled target genomic nucleic acid comprises sequences representing a defined part of or substantially an entire chromosome or genome; wherein the printed matter comprises instructions on hybridizing the sample of target nucleic acid to a nucleic acid array. In alternative embodiments, the kits' target genomic nucleic acid is smaller than about 175 bases; about 150 bases; about 125 bases; about 100 bases; about 75 bases; about 50 bases; about 40 bases; about 30 bases; or about 25 bases. In an alternative

WU 01/4639

PC17US01/13038

embodiment, the genomic DNA from which the target or the probe is derived comprises a mammalian genome, such as a mouse or a human genome.

The invention provides a method for hybridizing a sample of labeled nucleic acid targets to a plurality of nucleic acid probes, comprising the following steps: (a) providing a sample of nucleic acid targets comprising fluorescently-labeled nucleic acid fragments and a plurality of nucleic acid probes, wherein the fluorescent label is sensitive to oxidation; (b) contacting the nucleic acid target and nucleic acid probe of step (a) under conditions allowing hybridization of the sample with the probe, wherein the hybridization conditions comprise use of a hybridization solution comprising at least one antioxidant, wherein the amount of antioxidant in the solution is sufficient to inhibit the oxidation of the fluorescent label under the hybridization conditions. In one embodiment, the fluorescent label comprises Cy5™ or equivalent. In alternative embodiments, the fluorescent dye comprises a rhodamine, a fluorescein or an aryl-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene dye or equivalents.

The invention also provides a method for hybridizing a sample of Cy5™-labeled nucleic acid targets to a plurality of nucleic acid probes, comprising the following steps: (a) providing a sample of nucleic acid targets comprising Cy5™-labeled nucleic acid fragments and a plurality of nucleic acid probes; (b) contacting the nucleic acid target and nucleic acid probe of step (a) under conditions allowing hybridization of the sample with the probe, wherein the hybridization conditions comprise use of a hybridization solution comprising at least one antioxidant, wherein the amount of antioxidant in the solution is sufficient to inhibit the oxidation of the Cy5™ under the hybridization conditions. The invention also provides a wash solution comprising a Cy5™-labeled nucleic acid comprising at least one antioxidant, wherein the amount of antioxidant in the solution is sufficient to inhibit the oxidation of the Cy5™ under the hybridization conditions.

The invention provides a composition comprising a sample of Cy5™-labeled nucleic acid in a solution comprising at least one antioxidant.

The invention also provides a kit comprising a sample of fluorescently-labeled nucleic acid in a solution comprising at least one antioxidant and printed matter, wherein the printed matter comprises instructions on using the labeled nucleic acid in a hybridization reaction with another nucleic acid. In alternative

WU 01/14630

FCT7US01/11838

embodiments, the fluorescent dye comprises a rhodamine, a fluorescein or an aryl-substituted 4,4'-difluoro-4-benz-3a, 4a-diaz-5-undecene dye or equivalents. The invention also provides a kit comprising a sample of CysTM-labeled nucleic acid in a solution comprising at least one antioxidant and printed matter, wherein the printed matter comprises instructions on using the CysTM-labeled nucleic acid in a hybridization reaction with another nucleic acid. The kits can further comprise a wash solution, including a wash solution comprising at least one antioxidant.

In alternative embodiments, the antioxidant is present in solution, e.g., in a hybridization, wash and/or other solution, at a concentration of about 25 mM to about 1 M, about 50 mM to about 750 mM, about 50 mM to about 500 mM, and about 100 mM to about 500 mM.

In these compositions and methods, in alternative embodiments, the antioxidant comprises a mercapto-containing compound, or equivalent, such as a 2-mercapto-ethylamine, a thiol N-acetylcysteine, an ovothiol, a 4-mercaptoimidazole. In another embodiment, the antioxidant comprises an antioxidant vitamin-containing compound, such as an ascorbic acid (Vitamin C) or a tocopherol (Vitamin E), or equivalent. In another embodiment, the antioxidant comprises a propyl gallate, such as an n-propyl gallate, or equivalent. In another embodiment, the antioxidant comprises a beta-carotene, or equivalent. In another embodiment, the antioxidant comprises a butylated hydroxytoluene (BHT) or a butylated hydroxyanisole (BHA), or equivalent.

The invention provides a method for hybridizing a sample of nucleic acid targets to a plurality of immobilized nucleic acid probes, comprising the following steps: (a) providing a sample of nucleic acid targets and a plurality of immobilized nucleic acid probes; (b) contacting the nucleic acid target and nucleic acid probe of step (a) under conditions allowing hybridization of the sample with the probe, wherein the hybridization conditions comprise a controlled hybridization environment comprising an unsaturated humidity environment. In alternative embodiments, the unsaturated humidity environment is controlled to about 90% humidity, about 80% humidity, about 70% humidity, about 60% humidity, about 50% humidity, about 40% humidity, about 30% humidity, and about 20% humidity.

WU 01/14630

PCT/US01/12638

In one embodiment, the humidity of the controlled environment is periodically changed during the hybridization of step (b). The change can be step-wise, or can be gradual. The humidity can be changed any number of times for any length of time. In alternative embodiments, the humidity is periodically changed at
5 about three hour intervals, at about two hour intervals, at about one hour intervals, at about 30 minute intervals, at about 15 minute intervals or at about 5 minute intervals, or a combination thereof.

In one embodiment, the hybridization conditions comprise a controlled temperature environment. The humidity of the controlled environment can be
10 periodically changed during the hybridization of step (b). The change can be step-wise, or can be gradual. The temperature can be changed any number of times for any length of time. In alternative embodiments, the temperature is periodically changed at about three hour intervals, at about two hour intervals, at about one hour intervals, at about 30 minute intervals, at about 15 minute intervals or at about 5 minute intervals,
15 or a combination thereof.

The invention provides a composition comprising an array of immobilized nucleic acids in a housing, wherein the housing comprises a component to measure and control the humidity in the housing. In one embodiment, the housing further comprises a component to measure and control the temperature in the housing.
20 The housing can further comprise a component that allows programmable or preset control of the humidity and the temperature.

The invention provides an array of immobilized probe nucleic acids in a humidity-controlled housing, wherein the housing comprises a means to control the amount of humidity in the housing during hybridization of the probes to a target in an aqueous hybridization solution.
25

The invention provides an array of immobilized probe nucleic acids in a humidity-controlled housing, wherein the housing comprises a humidifier component that can control the amount of humidity in the housing during contact of the probes to an aqueous hybridization solution.

30 The invention provides a kit comprising an array of immobilized nucleic acids in a housing and printed matter, wherein the housing comprises a component to control the amount of humidity in the housing, a component to control

WU 01/44630

PCT/US01/2838

the temperature in the housing, and a component to preset or program control of the humidity and the temperature, and the printed matter comprises instructions for presetting or programming conditions in the housing to hybridize a target to the immobilized nucleic acids of the array under controlled hybridization conditions that comprise fluctuation of humidity and temperature during a nucleic acid hybridization step.

The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the accompanying drawings and the description below. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description and drawings, and from the claims.

All publications, patents, patent applications, GenBank sequences and ATCC deposits cited herein are hereby expressly incorporated by reference for all purposes.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1 is a schematic drawing of 5-amino-propargyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate coupled to CysTM or CysTM, as described in detail, below.

Figure 2 is a schematic drawing of an unbalanced humidity hybridization format, as described in detail in Example 1, below.

Like reference symbols in the various drawings indicate like elements.

DETAILED DESCRIPTION

The invention provides novel methods and compositions for array-based nucleic acid hybridizations. New methods and compositions are provided for generating a molecular profile of genomic DNA by hybridization of a target nucleic acid derived from genomic DNA to an immobilized nucleic acid probe, e.g., as in an "array-based comparative genomic hybridization (CGH)."

In one embodiment, the invention provides a method for generating a molecular profile of one or more genomes, or a defined portion of a genome, e.g., a chromosome or part of a chromosome, by hybridization of target nucleic acid derived from genomic DNA to an immobilized nucleic acid probe(s), e.g., in the form of an

WU 01/4639

PC/T/US01/12638

array. The method comprises contacting the immobilized nucleic acid segment (e.g., cloned DNA) with a sample of target nucleic acid comprising fragments of genomic nucleic acid labeled with a detectable moiety. Each labeled fragment consists of a length smaller than about 200 bases. Use of labeled genomic DNA limited to this small size significantly improves the resolution of the molecular profile analysis, e.g., in array-based CGH. For example, use of such small fragments allows for significant suppression of repetitive sequences and other unwanted, "background" cross-hybridization on the immobilized nucleic acid. Suppression of repetitive sequence hybridization greatly increases the reliability of the detection of copy number differences (e.g., amplifications or deletions) or detection of unique sequences.

Labeled genomic DNA is a promiscuous mix containing more than 30% repetitive sequences and an unknown proportion of closely related sequences. Traditional protocols, particularly CGH methodologies, use significantly longer labeled genomic fragments than the fragments of the compositions and methods of the invention (fragments less than about 200 bases) to hybridize with immobilized genomic DNA, e.g., fixed metaphase chromosomes or nucleic acid arrays. These longer sequences cause a significant amount of unwanted cross-hybridization with repetitive and closely related sequences. In practicing the methods of the invention by using labeled target genomic nucleic acid smaller than about 200 bases effectively significantly reduces the amount of repetitive sequence hybridization and cross-hybridization from closely related sequences seen when traditional protocols are used. The resolution can also be significantly greater.

While the invention is not limited by any particular mechanism of action, the superior effectiveness of the methods of the invention may be because DNA probes fragmented to a smaller size (i.e., less than about 200 residues) have a lower possibility of partially hybridizing to closely related sequences under moderate or stringent hybridization conditions, e.g., the conditions typically used in array-based CGH. When the target sequence is sufficiently small, particularly under stringent hybridization conditions, only a perfectly matched sequence will hybridize at a specific hybridization temperature. For instance, in one exemplary scenario, two 200 base DNA molecules form a duplex molecule at 65°C by pairing 100 bases; two 100 base single stranded dangling ends remain. These "dangling" single stranded ends

WO 01/44330

PCT/US01/12338

can further hybridize to other DNA molecules. However, as the size of one or both of the molecules becomes less than 200 bases (with the hybridizing segments remaining 100 bases), the size of the "dangling end(s)" decreases and the probability that the non-hybridized ends will further hybridize to another fragment of DNA (resulting in "aggregating hybridization") also proportionally decreases. In microarray hybridization, such as array-based CGH, this "aggregation hybridization" not only makes the hybridization less quantitative but also causes high background. Accordingly, the compositions and methods of the invention provide fragmented DNA probes to a size range of less than about 200 bases, e.g., between about 25 to about 30 to about 150 bases, or, about 50 to about 100 bases. In one embodiment, fragments of labeled nucleic acid derived from genomic DNA are first prepared by random priming, nick translation, amplification, or equivalents, followed by fragmentation to less than about 200 bases, as low as about 25 to about 30 bases; random priming, nick translation or amplification with degenerate primers typically generate labeled fragments ranging in size from about 200 to about 500 bases. Shear forces can be used to fragment this labeled nucleic acid; however, with shearing it is very difficult to fragment DNA to a size smaller than 200 bases. Accordingly, additional techniques, e.g., enzyme digestion, e.g., by DNase, or equivalent, is used to generate the smaller labeled pieces used as targets in the methods and compositions of the invention.

In addition to controlling the size of labeled genomic nucleic acid used to hybridize with the immobilized array DNA, the invention also provides compositions and methods for increasing the stability of nucleic acid-label conjugates that are sensitive to oxidation in solution, particularly, in hybridization solutions. Labels that are sensitive to oxidants, including free radicals, include many fluorescent dyes, particularly, Cy5TM. Oxidation of the fluorescent dye quenches its ability to transmit a detectable signal; thus the presence of compositions or conditions that can oxidize a dye can significantly adversely effect the results of a hybridization reaction. This is particularly important if hybridization signals are to be detected and analyzed quantitatively. Accordingly, use of antioxidants and free-radical formation inhibitors in the compositions and methods of the invention can significantly increase the level

WU 01/44130

PC17US01/12838

of detectable signal from, e.g., a fluor, when very low or small amounts of fluor need to be detected, protection of even small amounts of fluor can be significant.

One current paradigm of comparative hybridization (CGH) is to use the fluorescent dyes Cy3™ and Cy5™ to differentially label nucleic acid fragments from two samples, e.g., nucleic acid generated from a control versus a test cell or tissue. Because of their superior spectral property and stability, Cy3™ and Cy5™ are almost exclusively used in current comparative hybridization protocols. Many commercial instruments are designed to accommodate detection of these two dyes.

However, Cy5™ is not stable in most currently used hybridization solutions. Before this invention, loss of Cy5™ signal in the labeling reactions was mistakenly attributed to a low Cy5™ incorporation rate; incorporation of Cy5™-base conjugates into a nucleic acid fragment typically generated by primer extension of genomic DNA samples. While the invention is not limited by any particular mechanism of action, the present inventors found that the instability of Cy5™ at elevated temperature (e.g., at temperatures used for array-based CGH hybridization and other stringent hybridization procedures) is due to a long unsaturated carbon chain in its molecular backbone that is susceptible to radical attack. To increase the stability of Cy5™, or fluors or other oxidation-sensitive compounds, the invention provides methods and compositions that incorporate antioxidants and free radical scavengers in the hybridization mix, and, in one embodiment, the hybridization and the wash solutions. Using the methods and compositions of the invention, Cy5™ signals are dramatically increased and longer hybridization times are possible.

To further increase the hybridization sensitivity, the invention provides novel hybridization formats, or methodologies. In one embodiment of the invention, the hybridization is carried out in a controlled, unsaturated humidity environment (current methodologies/ protocols typically use 100% or near saturated humidity, see, e.g., Shalon (1996) Genome Res. 6:639-6450). In this embodiment of the invention, hybridization efficiency is significantly improved if the humidity is not saturated.

In another embodiment of the invention, the hybridization efficiency is further improved if the humidity is dynamically controlled, i.e., if the humidity changes during hybridization. Mass transfer will be facilitated in a dynamically balanced humidity environment. The humidity in the hybridization environment can

WO 01/44630

PCT/US91/12838

be adjusted stepwise or continuously. Also provided are array devices comprising housings and controls that allow the operator to control the humidity during pre-hybridization, hybridization, wash and/or detection stages. In one embodiment, the device has detection, control and memory components to allow pre-programming of the humidity (and temperature (see below), and other parameters) during the entire procedural cycle, including pre-hybridization, hybridization, wash and detection steps.

The novel hybridization methods of the invention also provide hybridization conditions comprising temperature fluctuation. As is seen when the humidity is controllably changed, mass transfer is also facilitated in a dynamically balanced temperature environment. Hybridization has much better efficiency in a changing temperature environment as compared to conditions where the temperature is set precisely or at relatively constant level (e.g., plus or minus a couple of degrees, as with most commercial ovens). While the invention is not limited by any particular mechanism of action, the mixing caused either by temperature or humidity fluctuation increases hybridization efficiency. As noted above, the invention also provides devices for carrying out array-based hybridizations under precisely controlled environmental conditions, including dynamic control of temperature, humidity and other factors. Reaction chamber temperatures can be fluctuatingly modified by, e.g., an oven, or other device capable of creating changing temperatures.

The novel hybridization methods of the invention also provide hybridization conditions comprising osmotic fluctuation. Hybridization efficiency (i.e., time to equilibrium) can also be enhanced by a hybridization environment that comprises changing hyper-/hypo-tonicity, e.g., a solute gradient. In one embodiment, a solute gradient is created in the device. In one exemplary device, a low salt hybridization solution is placed on one side of the array hybridization chamber and a higher salt buffer is placed on the other side to generate a solute gradient in the chamber.

WU 01/04/00

FC77US01/12834

DEFINITIONS

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by a person skilled in the art to which this invention belongs. As used herein, the following terms have the meanings ascribed to them unless specified otherwise.

The term "antioxidant" includes any compound capable of inhibiting or preventing the oxidation of a second compound, such as a fluorescent dye, and, in particular, the fluorochrome Cy5™ in an aqueous solution. Accordingly, the term also includes all compounds which exhibit an anti-free radical protective effect.

Antioxidants and free radical scavengers are described in detail, below. A compound is considered to be an effective anti-oxidant or free-radical inhibitor if it has any degree of protective effect on the oxidation-sensitive compound during hybridization (i.e., less Cy5™ fluor oxidized during the course of the hybridization procedure).

The term "aryl-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene dye" as used herein includes all "boron dipyrromethene difluoride fluorophore" or "BODIPY" dyes and "dipyrrometheneboron difluoride dyes" (see, e.g., U.S. Patent No. 4,774,339), or equivalents, are a class of fluorescent dyes commonly used to label nucleic acids for their detection when used in hybridization reactions; see, e.g., Chen (2000) J. Org. Chem. 65:2900-2906; Chen (2000) J. Biochem. Biophys. Methods 42:137-151. See also U.S. Patent Nos. 6,060,324; 5,994,063; 5,614,386; 5,248,782; 5,227,487; 5,187,288.

The terms "cyanine 5" or "Cy5™" and "cyanine 3" or "Cy3™" refer to fluorescent cyanine dyes produced by Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL), as described in detail, below, or equivalents. See U.S. Patent Nos. 6,027,709; 5,714,586; 5,263,486; 5,151,507; 5,047,519. These dyes are typically incorporated into nucleic acids in the form of 5-amino-propargyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate coupled to Cy5™ or Cy3™. See Figure 1.

The term "fluorescent dye" as used herein includes all known fluors, including rhodamine dyes (e.g., tetramethylrhodamine, dibenzorhodamine, see, e.g., U.S. Patent No. 6,051,719); fluorescein dyes; "BODIPY" dyes and equivalents (e.g., dipyrrometheneboron difluoride dyes, see, e.g., U.S. Patent No. 5,274,113);

WO 01/44639

PCT/US01/12438

derivatives of 1-[isobutyl]methylamino-isobutole (see, e.g., U.S. Patent No. 5,433,895); and all equivalents. See also U.S. Patent Nos. 6,028,190; 5,188,934.

The terms "hybridizing specifically to" and "specific hybridization" and "selectively hybridize to," as used herein refer to the binding, duplexing, or hybridizing of a nucleic acid molecule preferentially to a particular nucleotide sequence under stringent conditions. The term "stringent conditions" refers to conditions under which a probe will hybridize preferentially to its target subsequence, and to a lesser extent to, or not at all to, other sequences. A "stringent hybridization" and "stringent hybridization wash conditions" in the context of nucleic acid hybridization (e.g., as in array, Southern or Northern hybridizations) are sequence dependent, and are different under different environmental parameters. Stringent hybridization conditions that can be used to identify nucleic acids within the scope of the invention can include, e.g., hybridization in a buffer comprising 50% formamide, 5x SSC, and 1% SDS at 42°C, or hybridization in a buffer comprising 5x SSC and 1% SDS at 65°C, both with a wash of 0.2x SSC and 0.1% SDS at 65°C. Exemplary stringent hybridization conditions can also include a hybridization in a buffer of 40% formamide, 1 M NaCl, and 1% SDS at 37°C, and a wash in 1x SSC at 45°C. Alternatively, hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1x SSC/0.1% SDS at 68°C can be used to identify and isolate nucleic acids within the scope of the invention. Those of ordinary skill will readily recognize that alternative but comparable hybridization and wash conditions can be utilized to provide conditions of similar stringency. However, the selection of a hybridization format is not critical, as is known in the art, it is the stringency of the wash conditions that set forth the conditions which determine whether a nucleic acid is within the scope of the invention. Wash conditions used to identify nucleic acids within the scope of the invention include, e.g.: a salt concentration of about 0.02 molar at pH 7 and a temperature of at least about 50°C or about 55°C to about 60°C; or, a salt concentration of about 0.15 M NaCl at 72°C for about 15 minutes; or, a salt concentration of about 0.2x SSC at a temperature of at least about 50°C or about 55°C to about 60°C for about 15 to about 20 minutes; or, the hybridization complex is washed twice with a solution with a salt concentration of about 2x SSC containing

WU 01/04633

PC/TYUS01/12838

0.1% SDS at room temperature for 15 minutes and then washed twice by 0.1X SSC containing 0.1% SDS at 68°C for 15 minutes; or, equivalent conditions. Stringent conditions for washing can also be, e.g., 0.2 X SSC/0.1% SDS at 42°C. In instances wherein the nucleic acid molecules are deoxyoligonucleotides ("oligos"), stringent conditions can include washing in 6X SSC/0.05% sodium pyrophosphate at 37°C (for 14-base oligos), 48°C (for 17-base oligos), 55°C (for 20-base oligos), and 60°C (for 23-base oligos). See Sambrook, Ausubel, or Tijssen (cited below) for detailed descriptions of equivalent hybridization and wash conditions and for reagents and buffers, e.g., SSC buffers and equivalent reagents and conditions.

The term "labeled with a detectable composition" or "labeled with a detectable moiety" as used herein refers to a nucleic acid attached to a detectable composition, i.e., a label, as described in detail, below. This includes incorporation of labeled bases (or, bases which can bind to a detectable label) into the nucleic acid by, e.g., nick translation, random primer extension, amplification with degenerate primers, and the like. The label can be detectable by any means, e.g., visual, spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, physical or chemical means.

The term "a molecular profile of genomic DNA" means detection of regions of amplification, deletions and/or unique sequences in a test sample of nucleic acid representing a genomic DNA as compared to a control (e.g., "normal") sample of DNA.

The term "nucleic acid" as used herein refers to a deoxyribonucleotide or ribonucleotide in either single- or double-stranded form. The term encompasses nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides. The term also encompasses nucleic acid-like structures with synthetic backbones. DNA backbone analogues provided by the invention include phosphodiester, phosphorothioate, phosphorodithioate, methylphosphonate, phosphoramidate, alkyl phosphotriester, sulfamate, 3'-thioacetal, methylene(methylimino), 3'-N-carbamate, morpholino carbamate, and peptide nucleic acids (PNAs); see Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, edited by F. Eckstein, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 600, Eds Baserga and Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) J. Med. Chem. 36:1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press). PNAs contain non-ionic

WO 01/44633

PCT/US01/12438

backbones, such as N-(2-aminooethyl) glycine units. Phosphorothioate linkages are described, e.g., by U.S. Patent Nos. 6,031,092; 6,001,932; 5,694,148; see also, WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197. Other synthetic backbones encompassed by the term include methyl-phosphonate linkages or alternating methyl-phosphonate and phosphodiester linkages (see, e.g., U.S. Patent No. 5,962,674; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698), and benzylphosphonate linkages (see, e.g., U.S. Patent No. 5,532,226; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156). The term nucleic acid is used interchangeably with gene, DNA, RNA, cDNA, mRNA, oligonucleotide primer, probe and amplification product.

The terms "array" or "microarray" or "DNA array" or "nucleic acid array" or "biochip" as used herein is a plurality of target elements, each target element comprising a defined amount of one or more nucleic acid molecules, or probes (defined below), immobilized on a solid surface for hybridization to sample nucleic acids, as described in detail, below. The term "probe(s)" or "nucleic acid probe(s)" as used herein, is defined to be a collection of one or more nucleic acid fragments (e.g., immobilized nucleic acid, e.g., a nucleic acid array) whose hybridization to a sample of target nucleic acid (defined below) can be detected.

The term "sample of nucleic acid targets" or "sample of nucleic acid" as used herein refers to a sample comprising DNA or RNA, or nucleic acid representative of DNA or RNA isolated from a natural source, in a form suitable for hybridization (e.g., as a soluble aqueous solution) to another nucleic acid or polypeptide or combination thereof (e.g., immobilized probes). The nucleic acid may be isolated, cloned or amplified; it may be, e.g., genomic DNA, mRNA, or cDNA from substantially an entire genome, substantially all or part of a particular chromosome, or selected sequences (e.g. particular promoters, genes, amplification or restriction fragments, cDNA, etc.). The nucleic acid sample may be extracted from particular cells or tissues. The cell or tissue sample from which the nucleic acid sample is prepared is typically taken from a patient suspected of having a genetic defect or a genetically-linked pathology or condition, e.g., a cancer, associated with genomic nucleic acid base substitutions, amplifications, deletions and/or translocations. Methods of isolating cell and tissue samples are well known to those

WO 01/44530

PC7US21/12834

of skill in the art and include, but are not limited to, aspirations, tissue sections, needle biopsies, and the like. Frequently the sample will be a "clinical sample" which is a sample derived from a patient, including sections of tissues such as frozen sections or paraffin sections taken for histological purposes. The sample can also be derived from supernatants (of cells) or the cells themselves from cell cultures, cells from tissue culture and other media in which it may be desirable to detect chromosomal abnormalities or determine amplicon copy number. In some cases, the nucleic acids may be amplified using standard techniques such as PCR, prior to the hybridization. In alternative embodiments, the target nucleic acid may be unlabeled, or labeled (as, e.g., described herein) so that its binding to the probe (e.g., oligonucleotide, or clone, immobilized on an array) can be detected. The probe can be produced from and collectively can be representative of a source of nucleic acids from one or more particular (pre-selected) portions of, e.g., a collection of polymerase chain reaction (PCR) amplification products, substantially an entire chromosome or a chromosome fragment, or substantially an entire genome, e.g., as a collection of clones, e.g., BACs, PACs, YACs, and the like (see below). The probe or genomic nucleic acid sample may be processed in some manner, e.g., by blocking or removal of repetitive nucleic acids or by enrichment with selected nucleic acids.

Generating and Manipulating Nucleic Acids

The invention provides compositions, including nucleic acid arrays, and methods for performing nucleic acid hybridization reactions. As described herein, the labeled target nucleic acid for analysis and the immobilized nucleic acid on the array can be representative of genomic DNA, including defined parts of, or entire, chromosomes, or entire genomes. In several embodiments, the arrays and methods of the invention are used in comparative genomic hybridization (CGH) reactions, including CGH reactions on arrays (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,830,645; 5,976,790). These reactions compare the genetic composition of test versus controls samples; e.g., whether a test sample of genomic DNA (e.g., from a cell suspected of having a genetic defect) has amplified or deleted or mutated segments, as compared to a "negative" control, e.g., "normal" wild type genotype, or "positive" control, e.g., known cancer cell or cell with a known defect, e.g., a translocation or amplification or the like.

WU 01/04630

PC17US01/12838

In other embodiments, the test sample comprises fragments of nucleic acid representative of defined parts of a chromosome or genome, or the entire genome. The test sample can be labeled, e.g., with a detectable moiety, e.g., a fluorescent dye. Typically, the test sample nucleic acid is labeled with a first and the control (e.g., "normal") sample is labeled with a second dye (e.g., Cy3TM and Cy5TM). Test and control samples are both applied to the immobilized probes (e.g., on the array) and, after hybridization and washing, the location (e.g., spots on the array) and amount of each dye are read. The immobilized nucleic acid can be representative of any part of or all of a chromosome or genome. If immobilized to an array, this nucleic acid can be in the form of cloned DNA, e.g., YACs, BACs, PACs, and the like, as described herein. As is typical of array technology, each "spot" on the array has a known sequence, e.g., a known segment of genome or other sequence. The invention can be practiced in conjunction with any method or protocol or device known in the art, which are well described in the scientific and patent literature.

15 General Techniques

The nucleic acids used to practice this invention, whether RNA, cDNA, genomic DNA, vectors, viruses or hybrids thereof, may be isolated from a variety of sources, genetically engineered, amplified, and/or expressed/ generated recombinantly. Any recombinant expression system can be used, including, in addition to bacterial cells, e.g., mammalian, yeast, insect or plant cell expression systems.

Alternatively, these nucleic acids can be synthesized *in vitro* by well-known chemical synthesis techniques, as described in, e.g., Caruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Bloemers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beattie (1981) Tetra. Lett. 22:1859; U.S. Patent No. 4,458,066. Double stranded DNA fragments may then be obtained either by synthesizing the complementary strand and annealing the strands together under appropriate conditions, or by adding the complementary strand using DNA polymerase with a primer sequence.

WU 01/04639

PCT/US91/12438

Techniques for the manipulation of nucleic acids, such as, e.g., subcloning, labeling probes (e.g., random-primer labeling using Klenow polymerase, nick translation, amplification), sequencing, hybridization and the like are well described in the scientific and patent literature, see, e.g., Sambrook, ed., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); *LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES*, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Another useful means of obtaining and manipulating nucleic acids used in the compositions and methods of the invention is to clone from genomic samples, and, if necessary, screen and re-clone inserts isolated (or amplified) from, e.g., genomic clones or cDNA clones or other sources of complete genomic DNA. Thus, forms of genomic nucleic acid used in the methods and compositions of the invention (including arrays and test samples) include genomic or cDNA libraries contained in, or comprised entirely of, e.g., mammalian artificial chromosomes (see, e.g., Ascenzioni (1997) *Cancer Lett.* 118:135-142; U.S. Patent Nos. 5,721,118; 6,025,155) (including human artificial chromosomes, see, e.g., Warburton (1997) *Nature* 386:553-555; Roush (1997) *Science* 276:38-39; Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:333-335); yeast artificial chromosomes (YAC); bacterial artificial chromosomes (BAC); P1 artificial chromosomes (see, e.g., Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; Boren (1996) *Genome Res.* 6:1123-1130); PACs (a bacteriophage P1-derived vector, see, e.g., Ioannou (1994) *Nature Genet.* 6:84-89; Reid (1997) *Genomics* 43:366-375; Northrup (1997) *Genomics* 41:370-378; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124); cosmids, plasmids or cDNAs. BACs are vectors that can contain 120 Kb or greater inserts. BACs are based on the *E. coli* F factor plasmid system and simple to manipulate and purify in microgram quantities. Because BAC plasmids are kept at one to two copies per cell, the problems of rearrangement observed with YACs, which can also be employed in the present methods, are eliminated; see, e.g., Asakawa (1997) *Gene* 69-79; Cau (1999) *Genome Res.* 9:763-774. BAC vectors can include marker genes, such as, e.g., luciferase and green fluorescent protein genes

WO 01/44639

PCT/US01/12438

(see, e.g., Baker (1997) *Nucleic Acids Res* 25:1950-1956). YACS can also be used and contain inserts ranging in size from 50 to 700 kb, see, e.g., Tucker (1997) *Gene* 199:25-30; Adem (1997) *Plant J.* 11:1349-1356; Zeschütz (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:21. P1 is a bacteriophage that infects *E. coli* that can contain 75-100 Kb DNA inserts (see, e.g., Mejia (1997) *Genome Res* 7:179-186; Ioannou (1994) *Nat. Genet.* 6:84-89), and are screened in much the same way as lambda libraries. See also Ashworth (1995) *Analytical Biochem.* 224:564-571; Gingrich (1996) *Genomics* 32:65-74. Sequences, inserts, clones, vectors and the like can be isolated from natural sources, obtained from such sources as ATCC or GenBank libraries or commercial sources, or prepared by synthetic or recombinant methods.

Amplification of Nucleic Acids

Amplification using oligonucleotide primers can be used to generate nucleic acids used in the compositions and methods of the invention, to detect or measure levels of test or control samples hybridized to an array, and the like.

Amplification, typically with degenerate primers, is also useful for incorporating detectable probes (e.g., Cy5TM or Cy3TM-cytosine conjugates) into nucleic acids representative of test or control genomic DNA to be used to hybridize to immobilized genomic DNA. The skilled artisan can select and design suitable oligonucleotide amplification primers. Amplification methods are also well known in the art, and include, e.g., polymerase chain reaction, PCR (PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) and PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., ligase chain reaction (LCR) (see, e.g., Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Baninger (1990) *Gene* 89:117); transcription amplification (see, e.g., Kwok (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173); and, self-sustained sequence replication (see, e.g., Quatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874); Q Beta replicase amplification (see, e.g., Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491), automated Q-beta replicase amplification assay (see, e.g., Durg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10:257-271) and other RNA polymerase mediated techniques (e.g., NASBA, Cingene, Mississauga, Ontario); see also Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:307-316; Sambrook; Ausubel; U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202; Sooknman

WO 01/44633

PC/TUS01/12838

(1995) Biotechnology 13:563-564. See, e.g., U.S. Patent No. 6,653,571, describing use of polyamide-nucleic acid derivatives (PNAs) in amplification primers.

Hybridizing Nucleic Acids

In practicing the methods of the invention and using the compositions of the invention, test and control samples of nucleic acid are hybridized to immobilized probe nucleic acid, e.g., on arrays. In one embodiment, the hybridization and/or wash conditions are carried out under moderate to stringent conditions. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in, e.g., Sambrook Ausubel, Tijssen. Generally, highly stringent hybridization and wash conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Very stringent conditions are selected to be equal to the T_m for a particular probe. An example of stringent hybridization conditions for hybridization of complementary nucleic acids which have more than 100 complementary residues on an array or a filter in a Southern or northern blot is 42°C using standard hybridization solutions (see, e.g., Sambrook), with the hybridization being carried out overnight. An example of highly stringent wash conditions is 0.15 M NaCl at 72°C for about 15 minutes. An example of stringent wash conditions is a 0.2x SSC wash at 65°C for 15 minutes (see, e.g., Sambrook). Often, a high stringency wash is preceded by a medium or low stringency wash to remove background probe signal. An example medium stringency wash for a duplex of, e.g., more than 100 nucleotides, is 1x SSC at 45°C for 15 minutes. An example of a low stringency wash for a duplex of, e.g., more than 100 nucleotides, is 4x to 6x SSC at 40°C for 15 minutes.

Detectably Labeled Nucleic Acids

In some embodiments, the methods and compositions of the invention use nucleic acids representative of genomic DNA that have been conjugated to a detectable moiety, or into a nucleoside base conjugated to a detectable moiety (e.g., Cy3™ or Cy5™) has been incorporated (or, alternatively, a moiety that itself can bind to a detectable composition). The test samples can comprise labeled fragments of

WU 0174630

PCT/US01/20338

nucleic acid representative of part of or all of a chromosome, or an entire genome. In one embodiment, the test sample nucleic acid is conjugated with one label and the control sample is conjugated with a second label, wherein each label is differentially detectable (e.g., emits a difference signal). Test and control samples are both applied to the immobilized probes (e.g., on the array) and, after hybridization and washing, the location (e.g., spots on the array) and amount of each label are read simultaneously or sequentially.

Useful labels include ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I ; fluorescent dyes (e.g., Cy5TM, Cy3TM, FITC, rhodamine, lanthanide phosphors, Texas red), electron-dense reagents (e.g. gold), enzymes, e.g., as commonly used in an ELISA (e.g., horseradish peroxidase, beta-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase), colorimetric labels (e.g. colloidal gold), magnetic labels (e.g. DynabeadsTM), biotin, dioxigenin, or haptens and proteins for which antisera or monoclonal antibodies are available. The label can be directly incorporated into the nucleic acid or other target compound to be detected, or it can be attached to a probe or antibody which hybridizes or binds to the target. A peptide can be made detectable by incorporating (e.g., into a nucleoside base) predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, transcriptional activator polypeptides, metal binding domains, epitope tags). Label can be attached by spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance or impact on other useful or desired properties. See, e.g., Mansfield (1995) Mol Cell Probes 9:145-156. In array-based COH, typically fluors are paired together (one labeling control and another the test nucleic acid), e.g., rhodamine and fluorescein (see, e.g., DeRisi (1996) Nature Genetics 14:458-460), or lissamine-conjugated nucleic acid analogs and fluorescein-conjugated nucleotide analogs (see, e.g., Shalon (1996) supra); or Spectrum RedTM and Spectrum GreenTM (Vysis, Downers Grove, IL) or Cy3TM and Cy5TM (see below).

Cyanine and related dyes, such as merocyanine, styryl and oxonol dyes, are particularly strongly light-absorbing and highly luminescent, see, e.g., U.S. Patent Nos. 4,337,063; 4,404,289; 6,048,982. In one embodiment, Cy3TM and Cy5TM are used together; both are fluorescent cyanine dyes produced by Amersham Life Sciences (Arlington Heights, IL). They can be incorporated into "target" nucleic acid

WO 01/44633

PCT/US01/12838

by transcription (e.g., by random-primer labeling using Klenow polymerase, or "nick translation," or, amplification, or equivalent) of samples of genomic DNA, wherein the reaction incorporates Cy3TM- or Cy5TM-dCTP conjugates mixed with unlabeled dCTP. According to manufacturer's instructions, if generating labeled target by PCR, a mixture of 33% modified to 66% unmodified dCTP gives maximal incorporation of label; when modified dCTP made up 50% or greater, the PCR reaction was inhibited. Cy5TM is typically excited by the 633 nm line of HeNe laser, and emission is collected at 680 nm. See also, e.g., Bartosiewicz (2000) Archives of Biochem. Biophysics 376:66-73; Seheana (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619; Pinkel (1998) Nature Genetics 20:207-211; Pollack (1999) Nature Genetics 23:41-46.

Methods for labeling nucleic acids with fluorescent dyes and for the simultaneous detection of multiple fluorophores are known in the art, see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,339,517; 6,049,380; 6,054,279; 6,055,325. For example a spectrograph can image an emission spectrum onto a two-dimensional array of light detectors; a full spectrally resolved image of the array is thus obtained. Photophysics of the fluorophore, e.g., fluorescence quantum yield and photodestruction yield, and the sensitivity of the detector are read time parameters for an oligonucleotide array. With sufficient laser power and use of Cy5TM and/or Cy3TM, which have lower photodestruction yields an array can be read in less than 5 seconds.

When using two fluors together (e.g., as in a CGH), such as Cy3TM and Cy5TM, it is necessary to create a composite image of both fluors. To acquire the two images, the array can be scanned either simultaneously or sequentially. Charge-coupled devices, or CCDs, are commonly used in microarray scanning systems.

Data analysis can include the steps of determining, e.g., fluorescence intensity as a function of substrate position, removing "outliers" (data deviating from a predetermined statistical distribution), or calculating the relative binding affinity of the targets from the remaining data. The resulting data can be displayed as an image with color in each region varying according to the light emission or binding affinity between targets and probes. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,324,633; 5,863,504; 6,045,996. The invention can also incorporate a device for detecting a labeled marker on a sample located on a support, see, e.g., U.S. Patent No. 5,578,832.

Fragmentation and Digestion of Labeled Genomic Nucleic Acid

WO 01/4630

PCT/US01/12838

The invention provides methods and compositions using labeled genomic fragments of less than about 200 bases to as small as about 25 to about 30 bases. Typical CGH protocols use considerably larger labeled nucleic acids. In fact, some protocols recommend use of long fragments to improve intensity and uniformity of hybridization (See, e.g., Kallioniemi (1994) *Genes, Chromosomes & Cancer* 10:231-243).

As discussed above, as the size of target labeled nucleic acids becomes less than 200 bases, the size of unhybridized "dangling ends" decreases and the probability that the non-hybridized ends will further hybridize to another fragment of DNA, resulting in "aggregating hybridization," also decreases. In microarray hybridization, such as array-based CGH, this "aggregation hybridization" not only makes the hybridization less quantitative but also causes high background. Accordingly, the compositions and methods of the invention provide fragmented DNA probes to a size range of less than about 200 bases, as low as about 30 bases.

Typically, the labeled nucleic acid used in the hybridization procedures is generated from genomic DNA by standard "random priming," "nick translation" or degenerate PCR amplification (see, e.g., Sambrook, Ausubel, Speicher (1993) *Hum. Mol. Genet.* 2:1907-1914). However, the resultant fragments average about 200 to 400 bases, or more (see, e.g., Heiskanen (2000) *Cancer Res.* 60:799-802, where total genomic DNA labeled with biotin by nick translation generated fragment sizes of between 400 and 2000 bases). The fragment length can be modified by adjusting the ratio of DNase to DNA polymerase in the nick translation reaction; standard nick translation kits typically generate 300 to 600 base pair fragments (See, e.g., Kallioniemi (1994) *supra*).

To further fragment the labeled nucleic acid to segments below 200 bases, down to as low as about 25 to 30 bases, random enzymatic digestion of the DNA is carried out, using, e.g., a DNA endonuclease, e.g., DNase (see, e.g., Herrera (1994) *J. Mol. Biol.* 236:405-411; Suck (1994) *J. Mol. Recognit.* 7:65-70), or, the two-base restriction endonuclease CviJI (see, e.g., Fitzgerald (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:3753-3762) and standard protocols, see, e.g., Sambrook, Ausubel, with or without other fragmentation procedures.

WO 01/46330

PCT/US91/12438

Other procedures can also be used to fragment genomic DNA, e.g., mechanical shearing, sonication (see, e.g., Deininger (1983) *Anal. Biochem.* 129:216-223), and the like (see, e.g., Sambrook, Ausubel, Tijssen). For example, one mechanical technique is based on point-sink hydrodynamics that result when a DNA sample is forced through a small hole by a syringe pump, see, e.g., Thorstensen (1993) *Genomic Res.* 3:843-855. See also, Oefner (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:3879-3886; Ordahl (1976) *Nucleic Acids Res.* 3:2984-2999. Fragment size can be evaluated by a variety of techniques, including, e.g., sizing electrophoresis, as by Siles (1997) *J. Chromatogr. A.* 771:319-329, that analyzed DNA fragmentation using a dynamic size-sieving polymer solution in a capillary electrophoresis. Fragment sizes can also be determined by, e.g., matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, see, e.g., Chiu (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E31.

Antioxidant and Free Radical Scavengers

The invention provides methods and compositions comprising antioxidants and free radical scavengers, many of which are known in the art. For example, in one embodiment, the antioxidant can comprise a thiol-containing compound, or equivalent, such as a 2-mercapto-ethylamine, a thiol N-acetylcysteine, an overthiol, a 4-mercaptoimidazole. A vitamin-containing compound, such as an ascorbic acid (Vitamin C) or a tocopherol (Vitamin E), or equivalent, can also be used. Tocopherols can include variations and derivative forms, e.g., alpha-D-tocopherol, alpha-DL-tocopherol, alpha-D-tocopherol acetate, alpha-DL-tocopherol acetate, or alpha-D-tocopherol acid succinate (see, e.g., U.S. Patent Nos. 6,048,891; 6,048,988; 6,056,897). In another embodiment, the antioxidant comprises a propyl gallate, such as an n-propyl gallate, or equivalent. Beta-carotenes, or equivalent, or butylated hydroxytoluene (BHT) or butylated hydroxyanisole (BHA), or equivalent, can also be used.

Peptide and peptide derivatives have also been described to have antioxidant activity, see, e.g., U.S. Patent No. 5,804,535, describing the antioxidant action of a hydrolysate of lactoferrins. 2-mercaptoimidazole or 4-mercaptohistidine derivatives have also been described to have antioxidant activity, see, e.g., U.S. Patent No. 6,056,965 and U.S. Patent No. 4,898,878, respectively. Some cyclical hydroxylamines are useful for scavenging oxygen-centered free radicals, see, e.g.,

WU 01/04(32)

PC/T/US01/12438

U.S. Patent No. 5,981,548. Ascorbic acid 6-palmitate, dihydrolipoic acid have also been described as antioxidants, see, e.g., U.S. Patent No. 5,637,315. See also U.S. Patent No. 5,162,366.

Hybridization and wash solutions used in CGH and arrays are known in the art, see, e.g., Chering (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:15-19; see also, definitions discussion, above. The concentration of antioxidant in these solutions depends on a variety of factors: e.g., the composition of the hybridization or wash buffer, the concentration of composition to be "protected" from oxidation (e.g., Cy5™), the hybridization and wash conditions (e.g., length of time, heat, humidity, etc.). Thus, in various embodiments, the amount of antioxidant in a hybridization, wash or other solution, can be, e.g., at a concentration of about 25 mM to about 1 M, about 50 mM to about 750 mM, about 50 mM to about 500 mM, and about 100 mM to about 500 mM. However, any appropriate concentration of antioxidant or free radical scavenger can be used to practice the invention.

Additional effective antioxidants and free radicals can be readily determined, e.g., the development of a simple method for rapid screening of antioxidants in the preformulation phase of drug development is described by, e.g., Ugwu (1999) *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 53:252-259. Using an easily oxidizable drug substance containing a tetrahydroisoquinoline nucleus, the relative antioxidant efficacies can be determined by simultaneous measurement of dissolved oxygen depletion and drug disappearance rates in presence and absence of antioxidants. See also, e.g., *Methods Enzymol.* 1990;186:1-766; U.S. Patent No. 6,031,008.

Arrays, or "BioChips"

The invention provides improved variations of "arrays" or "microarrays" or "DNA arrays" or "nucleic acid arrays" or "biochips" (e.g., GeneChips®, Affymetrix, Santa Clara, CA). The arrays of the invention comprise housings comprising components for controlling humidity and temperature during the hybridization and wash reactions.

Arrays are generically a plurality of target elements, each target element comprising a defined amount of one or more nucleic acid molecules, or probes, immobilized a solid surface for hybridization to sample nucleic acids. The immobilized nucleic acids can contain sequences from specific messages (e.g., as

WO 01/44633

PCT/US01/12833

cDNA libraries) or genes (e.g., genomic libraries), including, e.g., substantially all or a subsection of a chromosome or substantially all of a genome, including a human genome. Other target elements can contain reference sequences and the like. The target elements of the arrays may be arranged on the solid surface at different sizes and different densities. The target element densities will depend upon a number of factors, such as the nature of the label, the solid support, and the like. Each target element may comprise substantially the same nucleic acid sequence, or, a mixture of nucleic acids of different lengths and/or sequences. Thus, for example, a target element may contain more than one copy of a cloned piece of DNA, and each copy may be broken into fragments of different lengths, as described herein. The length and complexity of the nucleic acid fixed onto the target element is not critical to the invention. The array can comprise nucleic acids immobilized on a solid surface (e.g., nitrocellulose, glass, quartz, fused silica, plastics and the like). See, e.g., U.S. Patent No. 6,063,338 describing multi-well platforms comprising cycloolefin polymers if fluorescence is to be measured. In some embodiments, the methods of the invention can be practiced on arrays of nucleic acids as described, for instance, in U.S. Patent Nos. 6,045,996; 6,022,963; 6,013,440; 5,959,098; 5,856,174; 5,770,456; 5,556,752; 5,143,854; see also, e.g., WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; see also, e.g., Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407; Rowlett (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32; Epstein (2000) *Current Opinion in Biotech.* 11:36-41.

Control of Humidity and Temperature During Hybridization

The invention provides methods and compositions where hybridization conditions comprise a controlled hybridization environment, particularly, an unsaturated humidity environment. The humidity and temperature of the controlled environment can be constant or periodically changed during the hybridization of step. The change can be step-wise, or can be gradual. In alternative embodiments, the unsaturated humidity environment is controlled to about 90% humidity, about 80% humidity, about 70% humidity, about 60% humidity, about 50% humidity, about 40% humidity, about 30% humidity, and about 20% humidity. In alternative embodiments, the humidity and/or temperature are periodically changed at about three hour

WU 01/44(3)

PC*77US01/12433

intervals, at about two hour intervals, at about one hour intervals, at about 30 minute intervals, at about 15 minute intervals or at about 5 minute intervals, or a combination thereof.

The invention also provides an array of immobilized probe nucleic acids in a humidity- and/or temperature-controlled housing. In one embodiment, the housing comprises a component to measure and control the amount of humidity and/or the temperature in the housing during hybridization. For example, the devices of the invention can comprise any temperature detection or control component, which are known in the art, e.g., thermal control modules comprising Peltier heat transfer devices for the control of temperature (these can be incorporated into the housing), see, e.g., U.S. Patent No. 6,017,434, using such devices in an electrophoretic medium; or the devices of the invention can comprise a sealed thermostatically controlled chamber in which fluids can easily be introduced (see, e.g., U.S. Patent No. 5,945,334); or they can comprise a system for the temperature adjustment treatment of liquids (see, e.g., U.S. Patent No. 5,919,622); or a reaction chamber for conducting elevated temperature reactions in a fluid-tight manner (see, e.g., U.S. Patent No. 5,882,503); or a biological chip plate with a fluid handling device (see, e.g., U.S. Patent No. 5,874,219); or a reaction vessel with a temperature control device manner (see, e.g., U.S. Patent No. 5,460,780). The devices of the invention also can comprise any humidity or water vapor detection or control component, or an adaptation or variation thereof; many of such devices are known in the art, e.g., U.S. Patent Nos. 4,436,674; 4,618,462; 4,921,642; 5,620,503; 5,806,762; and, 6,064,059, describing a device for detecting moisture conditions on a glass surface.

The component can include memory components to allow for pre-programming of hybridization conditions, including humidity and temperature and other environmental parameters.

It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims.

WU 01/04/00

PC*17CND1/12834

EXAMPLES

The following example is offered to illustrate, but not to limit the claimed invention.

Example 1: Array-based Nucleic Acid Hybridization

The following example demonstrates that the methods of the invention provide an improved and efficient means to practice array-based CGH.

Making BAC microarrays:

BAC clones greater than fifty kilobases (50 kb), and up to about 300 kb, were grown up in Terrific Broth medium (larger inserts, e.g., clones > 300 kb, or smaller inserts, about 1 to 20 kb, can also be used). DNA was prepared by a modified alkaline lysis protocol (see, e.g., Sambrook). The DNA was chemically modified as described by U.S. Patent No. 6,048,695. The modified DNA was then dissolved in proper buffer and printed directly on clean glass surfaces as described by U.S. Patent No. 6,048,695. Usually multiple spots were printed for each clone. Figure 2 is a schematic drawing of an unbalanced humidity hybridization format used in these studies.

Probe labeling and DNase enzyme fragmentation:

A standard random priming method was used to label genomic DNA, see, e.g., Sambrook. Cy3TM or Cy5TM labeled nucleotides were supplemented together with corresponding unlabeled nucleotides at a molar ratio ranging from 0.0 to about 6 (unlabeled nucleotide to labeled nucleotides). Labeling was carried out at 37 °C for 2 to 10 hours. After labeling the reaction mix was heated up to 95 °C to 100 °C for 3 to 5 minutes to inactivate the polymerase and denature the newly generated, labeled "probe" nucleic acid from the template.

The heated sample was then chilled on ice for 5 minutes. "Calibrated" DNase (DNA endonuclease) enzyme was added to fragment the labeled template (generated by random priming). "Trace" amounts of DNase was added (final concentration was 0.2 to 2 ng/ml; incubation time 15 to 30 minutes) to digest/fragment the labeled nucleic acid to segments of about 30 to about 100 bases in size.

Blocking repetitive sequences using Cot I DNA.

Cot I DNA was fragmented to sizes of between about 40 to 150 bases. 2 to 20 µg of fragmented Cot I DNA, together with about 10 to 30 µg of sheared

WU 01/14/03

PC77USJ1/12/03

salmon sperm or testes DNA (size range about 0.1 to 2kb) (carrier DNA, also can be other unrelated DNA), was dissolved in 2X to 6X SSPE with 0.2% to 10% base hybridization buffer (see e.g., Sambrook). The mix was applied to the array area, which was subsequently covered with a coverslip. The array was placed in a humidified chamber at 60 °C for 2 to 16 hours

Hybridization of labeled probes to arrays.

Two genomic fragments, each with 10,000 to 1,000,000 genome equivalents (derived from both human and mouse genomic DNA), were each labeled using either Cy3™ or Cy5™ fluorescent label, as described above. They were then co-precipitated with about 2 to 20 µg of Cot I and about 10 to 30 µg of carrier DNA or about 50 to 100 µg yeast tRNA. The mixture was dissolved in 10 to 20 µl base hybridization buffer (see above).

Antioxidants added to hybridization buffer

The antioxidant dithiothreitol (DTT) was added to a concentration of 10 to 500 mM to stabilize the fluorescent dyes. Other usable antioxidants include, e.g., n-propyl gallate, ascorbic acid (Vitamin C), Vitamin E (tocopherol), 2-mercaptoethylamine or other mercapto-containing compounds, as discussed above. The mix was applied to the array area, which was subsequently covered with a coverslip (see Figure 2). Hybridization was carried out in a humidified chamber with an average humidity of about 90 to 95% at 60 °C overnight in an oven with approximately +/- 3 °C of temperature fluctuation (temperature variation itself may cause fluctuations in the humidity in the closed chamber).

Humidity conditions fluctuated

Experiments also demonstrated that an unbalanced humidity environment significantly decreased the amount of time needed to reach equilibrium between soluble labeled nucleic acid and immobilized probe. A schematic of the device used in these experiments is presented in Figure 2. Both "unsealed" coverslips (to provide a "dynamic" humidity condition) and sealed coverslips (to provide the control 100% humidity environment) were used.

If the coverslip was sealed to prevent exchange of water vapor (i.e., a dynamic humidity environment) the rate of hybridization was significantly worse (a significantly longer period of time was needed to reach equilibrium). Rate of

WO 01/44630

PCT/US01/12628

hybridization was determined by measuring the amount of Cy3TM or Cy5TM generated fluorescence, i.e., the amount of labeled nucleic acid, hybridized to the immobilized probes on the array; fluorescence was measured using standard devices, as described above.

5 Post-hybridization washes:

The array was rinsed with high purity water several times after the coverslip was removed. The array was then washed in a solution comprising 0.1 to 2 X SSC with 0.1 to 1% SDS and 5 to 10 mM DTT antioxidant for 30 to 60 minutes. The array was then rinsed extensively with high purity water at room temperature (RT).

10 Image acquisition and data processing:

The fluorescent signals on microarrays are scanned into image files on a two color laser confocal scanner from GSI Lumonics (Oxnard, CA). For each array two images are acquired (for Cy3TM and Cy5TM). The relative fluorescent level or fluorescent ratio, which represents the relative amount of target sequences in the probe mix, was analyzed by comparing the fluorescent intensity of corresponding individual spots after proper background subtraction. Positional information of clones on the arrays and the chromosomes was correlated. The ratios were plotted along individual chromosome for easy inspection. For each sample two experiments were performed: Cy5TM-labeled nucleic acid (derived from tumor DNA) versus Cy3-labeled nucleic acid (derived from "normal" DNA) and Cy3-labeled nucleic acid (derived from tumor DNA) versus Cy5TM-labeled nucleic acid (derived from normal DNA). Thus when the Cy5TM to Cy3TM ratios are plotted together along individual chromosome the two ratio curves looked reciprocal to each other. By performing two reciprocal experiments any ratio artifact can be easily identified.

25 RESULTS:

In the above described studies, it was found that fluorescent signals were significantly stronger when the antioxidant dithiothreitol (DTT) was added to the hybridization buffer as compared to hybridization reactions lacking an antioxidant. Furthermore, the extent of "protection" against oxidation (i.e., stabilization of the fluorescent dye Cy5TM) increased as the concentration of antioxidant increased (from 10 mM to 500 mM). For example, after 12 hours of

WO 01/04632

PC7US01/12839

hybridization, with use of DTT, the Cy5™ signal remained constant. After 48 hours of hybridization, the control (no antioxidant) sample showed a significant deterioration of the Cy5™ signal, i.e., enough of the Cy5™ had oxidized to a non-fluorescing state that no signal was detectable). In contrast, the DTT-containing sample remained relatively constant, and, in some samples, the level of Cy5™ fluorescence actually increased.

In the above described studies, it was also found that an "unbalanced" or "dynamically changing" humidity and/or temperature environments during hybridization significantly shortened the period of time needed to reach equilibrium between soluble labeled nucleic acid and immobilized probe nucleic acid.

If the humidity in the array hybridization chamber had the same concentration of hybridization buffer throughout the chamber, the humidity remained relatively constant throughout the chamber. More time was needed to reach equilibrium (between soluble nucleic acid and immobilized probe) under these constant conditions than under "dynamic" humidity conditions, i.e., an environment conducive to an imbalanced humidity environment, e.g., as the environment created as illustrated in Figure 2. In this device, water was placed on one side of the array hybridization chamber and a 2X hybridization buffer was placed on the other side. Putting water on one side and 2X buffer on the other side generated a humidity gradient in the chamber. This resulted in an exchange of humidity around the four edges of the coverslip that unbalanced the humidity of the array hybridization chamber. The reaction chamber in Figure 2 was also incompletely (i.e., only "loosely") sealed to allow exchange of humidity with the outside environment.

While the invention is not limited by any particular mechanism of action, the dynamic humidity (and, similarly, dynamic temperature) conditions decrease the amount of self-association between the soluble, labeled nucleic acids; such self-association decreases their rate of hybridization to the immobilized probes on the array. Less self-association of soluble nucleic acid results in accelerated rate of association with immobilized probe, thereby decreasing the time needed to reach equilibrium.

Unbalanced humidity or temperature may also increase the movement of soluble sample to speed up the hybridization process. If the solution is relatively

WO 01/46630

PCT/US99/12438

static, as is the case in an unchanging humidity (or temperature) environment, the mass transfer process is limited to a diffusion mechanism, which is extremely slow. Under slower, static conditions a significant amount of soluble nucleic acid fragments associates with other soluble nucleic acids before they have a chance to associate and hybridize to immobilized array target sites.

Hybridization efficiency (i.e., time to equilibrium) can also be enhanced by a hybridization environment that comprises changing hyper-/hypo-tonicity, e.g., a solute gradient. Thus, in alternative embodiments of the device, a solute gradient is created, and, in another embodiment, can be maintained throughout the hybridization reaction. In one exemplary device, a low salt hybridization solution can be placed on one side of the array hybridization chamber and a higher salt buffer (e.g., a 2X hybridization buffer) can be placed on the other side to generate a solute gradient in the chamber.

Hybridization efficiency (i.e., rate to equilibrium) was also greatly enhanced when the reaction chamber temperature was fluctuatingly modified by, e.g., an oven, or other device capable of creating changing temperatures, as compared to the rate observed using a controlled, constant temperature environment (the enhancing temperature change being more than the approximately +/- three degrees variation typical of most laboratory ovens).

A number of embodiments of the invention have been described. Nevertheless, it will be understood that various modifications may be made without departing from the spirit and scope of the invention. Accordingly, other embodiments are within the scope of the following claims.

WO 01/44632

PC/TUS01/12938

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for generating a molecular profile of genomic DNA by hybridization of a genomic DNA target to an immobilized nucleic acid probe, comprising the following steps:
 - (a) providing a plurality of nucleic acid probes comprising a plurality of immobilized nucleic acid segments;
 - (b) providing a sample of target nucleic acid comprising fragments of genomic nucleic acid labeled with a detectable moiety, wherein each labeled fragment consists of a length smaller than about 200 bases; and
 - (c) contacting the genomic nucleic acid of step (b) with the immobilized probes of step (a) under conditions allowing hybridization of the target nucleic acid to the probe nucleic acid.
2. The method of claim 1, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 150 bases.
3. The method of claim 2, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 100 bases.
4. The method of claim 3, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 50 bases.
5. The method of claim 4, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 30 bases.
6. The method of claim 3, wherein each labeled fragment consists of a length between about 30 bases and about 150 bases.
7. The method of claim 1, wherein the sample of target genomic nucleic acid is prepared using a procedure comprising random priming, nick translation, amplification, or equivalent, of a sample of genomic nucleic acid to

WO 01/44639

PC/TUS91/12833

generate segments of target genomic nucleic acid; followed by a step comprising fragmentation or enzymatic digestion, or both, of the segments to generate a sample of target genomic nucleic acid consisting of sizes smaller than about 200 bases.

8. The method of claim 7, wherein the random priming, nick translation, amplification, or equivalent, of the sample of genomic nucleic acid to generate segments of target genomic nucleic acid incorporates detectably labeled base pairs into the segments.
9. The method of claim 8, wherein the detectable label comprises Cy3TM or Cy5TM or equivalent.
10. The method of claim 1, wherein the sample of target genomic nucleic acid is prepared using a procedure comprising fragmentation of a genomic DNA to sizes smaller than about 200 bases by DNase enzyme, or equivalent, digestion of the segments.
11. The method of claim 1, wherein the sample of target genomic nucleic acid is prepared using a procedure comprising fragmentation of a genomic DNA to sizes smaller than about 200 bases by applying shearing forces sufficient to fragment genomic DNA followed by DNase enzyme, or equivalent, digestion of the sheared DNA.
12. The method of claim 1, wherein the conditions allowing hybridization of the target nucleic acid to the probe nucleic acid comprise stringent hybridization conditions.
13. The method of claim 12, wherein the stringent hybridization conditions comprise a temperature of about 60°C to about 65°C.
14. The method of claim 1, wherein the target nucleic acid consists essentially of DNA derived from a human.

WU 01/04(33)

PC/T/US01/12638

15. The method of claim 1, wherein the sample of target genomic nucleic acid comprises sequences representing a defined part of or substantially an entire chromosome.

5

16. The method of claim 15, wherein the sample of target genomic nucleic acid comprises sequences representing substantially an entire genome.

17. The method of claim 15 or 16, wherein the chromosomal or genomic is derived from a human.

10

18. A composition comprising a sample of target nucleic acid comprising fragments of genomic nucleic acid labeled with at least one detectable moiety, wherein each labeled fragment has a length smaller than about 200 bases and the sample of labeled target genomic nucleic acid comprises sequences representing a defined part of or substantially a complete chromosome, or substantially a complete genome.

15

19. The composition of claim 18, wherein the target nucleic acid consists essentially of human DNA.

20

20. The composition of claim 18, wherein the chromosomal or genome is mammalian DNA.

25

21. The method of claim 20, wherein the DNA is human DNA.

22. The composition of claim 18, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 100 bases.

30

23. The composition of claim 22, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 50 bases.

WO 01/74433

PC17US01/12438

24. The composition of claim 23, wherein each labeled fragment consists of a length no more than about 50 bases.

25. The composition of claim 22, wherein each labeled fragment consists of a length between about 30 bases and about 100 bases.

26. The composition of claim 18, wherein the detectable label comprises Cy3™ or Cy5™ or equivalent.

27. A kit comprising a sample of target nucleic acid and printed matter, wherein the target nucleic acid comprises fragments of genomic nucleic acid labeled with a detectable moiety, wherein each labeled fragment consists of a length smaller than about 200 bases and the sample of labeled target genomic nucleic acid comprises sequences representing substantially an entire chromosome or genome; wherein the printed matter comprises instructions on hybridizing the sample of target nucleic acid to a nucleic acid array.

28. A method for hybridizing a sample of labeled nucleic acid targets to a plurality of nucleic acid probes, comprising the following steps:

(a) providing a sample of nucleic acid targets comprising fluorescent-labeled nucleic acid fragments and a plurality of nucleic acid probes, wherein the fluorescent label is sensitive to oxidation;

(b) contacting the nucleic acid target and nucleic acid probe of step (a) under conditions allowing hybridization of the sample with the probe, wherein the hybridization conditions comprise use of a hybridization solution comprising at least one antioxidant,

wherein the amount of antioxidant in the solution is sufficient to inhibit the oxidation of the fluorescent label under the hybridization conditions.

29. The method of claim 28, wherein the fluorescent label comprises Cy5™ or equivalent.

WU 01/04(3)

PCT/US01/12438

30. The method of claim 28, wherein the fluorescent dye comprises a rhodamine, a fluorescein or an aryl-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4c-diaza-s-indacene dye or equivalents.

31. The method of claim 28, wherein the antioxidant is present in the hybridization solution at a concentration of about 25 mM to about 1000 mM.

32. The method of claim 31, wherein the antioxidant is present in the hybridization solution at a concentration of about 50 mM to about 500 mM.

33. The method of claim 28, wherein the antioxidant comprises a mercapto-containing compound.

34. The method of claim 33, wherein the mercapto-containing compound comprises a 2-mercaptoethylamine, a thiol N-acetylcysteine, an olothiol, a 4-mercaptimidazole.

35. The method of claim 28, wherein the antioxidant comprises an antioxidant vitamin-containing compound.

36. The method of claim 35, wherein the antioxidant vitamin-containing compound comprises an ascorbic acid (Vitamin C) or a tocopherol (Vitamin E).

37. The method of claim 28, wherein the antioxidant comprises a propyl galate.

38. The method of claim 28, wherein the antioxidant comprises a beta-carotene.

39. The method of claim 28, wherein the antioxidant comprises a butylated hydroxytoluene (BHT) or a butylated hydroxyanisole (BHA).

WO 01/44632

PC77US01/12438

40. A composition comprising a sample of $Cy^{5'}$ -labeled nucleic acid or equivalent in a solution comprising at least one antioxidant.
- 5 41. The composition of claim 40, wherein the antioxidant is present in a hybridization solution at a concentration of about 25 mM to about 1000 mM.
42. The composition of claim 41, wherein the antioxidant is present in a hybridization solution at a concentration of about 50 mM to about 500 mM.
- 10 43. The composition of claim 40, wherein the antioxidant comprises a mercapto-containing compound.
44. The composition of claim 43, wherein the mercapto-containing compound comprises a 2-Mercaptoethylamine, a thiol N-acetylcysteine, an ovothiol, a 4-mercaptoimidazole.
- 15 45. The composition of claim 40, wherein the antioxidant comprises an antioxidant vitamin-containing compound.
- 20 46. The composition of claim 45, wherein the antioxidant vitamin-containing compound comprises ascorbic acid (Vitamin C) or a tocopherol (Vitamin E).
- 25 47. The method of claim 40, wherein the antioxidant comprises a propyl gallate.
48. The method of claim 40, wherein the antioxidant comprises a beta-carotene.
- 30 49. The method of claim 40, wherein the antioxidant comprises a butylated hydroxytoluene (BHT) or a butylated hydroxyanisole (BHA).

WO 01/44130

PCT/US01/12438

50. A kit comprising a sample of fluorescent dye-labeled nucleic acid or equivalent in a solution comprising at least one antioxidant and printed matter, wherein the printed matter comprises instructions on using the fluorescent dye-labeled nucleic acid in a hybridization reaction with another nucleic acid
51. The kit of claim 50 further comprising a hybridization complex wash solution comprising at least one antioxidant.
52. The kit of claim 50, wherein the fluorescent dye comprises a Cy5™ or equivalent.
53. The kit of claim 50, wherein the fluorescent dye comprises a rhodamine, a fluorescein or an aryl-substituted 4,4-difluoro-4-benz-3a, 4a-dize-s-indacene dye or equivalents.
54. A method for hybridizing a sample of nucleic acid targets to a plurality of immobilized nucleic acid probes, comprising the following steps:
- (a) providing a sample of nucleic acid targets and a plurality of immobilized nucleic acid probes;
 - (b) contacting the nucleic acid target and nucleic acid probe of step (a) under conditions allowing hybridization of the sample with the probe, wherein the hybridization conditions comprise a controlled hybridization environment comprising an unsaturated humidity environment.
55. The method of claim 54, wherein the unsaturated humidity environment is controlled at about 90% humidity, about 80% humidity, about 70% humidity, about 60% humidity, about 50% humidity, about 40% humidity, about 30% humidity, or about 20% humidity.
56. The method of claim 54, wherein the humidity of the controlled environment is periodically changed during the hybridization of step (b).

WU 01/44(3)

PC*77CNS01/12A38

57. The method of claim 56, wherein the humidity is periodically changed at about three hour intervals, at about two hour intervals, at about one hour intervals, at about 30 minute intervals, at about 15 minute intervals or at about 5 minute intervals, or a combination thereof.

58. The method of claim 54, wherein the hybridization conditions comprise a controlled temperature environment.

59. The method of claim 58, wherein the temperature of the controlled environment is periodically changed during the hybridization of step (b).

60. The method of claim 59, wherein the temperature is periodically changed at about three hour intervals, at about two hour intervals, at about one hour intervals, at about 30 minute intervals, at about 15 minute intervals or at about 5 minute intervals, or a combination thereof.

61. A composition comprising an array of immobilized nucleic acids in a housing, wherein the housing comprises a component to measure and control the humidity in the housing.

62. The composition of claim 61, wherein the housing further comprises a component to measure and control the temperature in the housing.

63. The composition of claim 62, wherein the housing further comprises a component that allows programmable or preset control of the humidity and the temperature.

64. An array of immobilized probe nucleic acids in a humidity-controlled housing, wherein the housing comprises a means to control the amount of humidity in the housing during hybridization of the probes to a target in an aqueous hybridization solution.

WO 01/74632

PC17US01/12638

65. An array of immobilized probe nucleic acids in a humidity-controlled housing, wherein the housing comprises a humidifier component that can control the amount of humidity in the housing during contact of the probes to an aqueous hybridization solution.

66. A kit comprising an array of immobilized nucleic acids in a housing and printed matter, wherein the housing comprises a component to control the amount of humidity in the housing, a component to control the temperature in the housing, and a component to preset or program control of the humidity and the temperature, and the printed matter comprises instructions for presetting or programming conditions in the housing to hybridize a target to the immobilized nucleic acids of the array under controlled hybridization conditions that comprise fluctuation of humidity and temperature during a nucleic acid hybridization step.

WU 01/04/030

FCT/USOL/12834

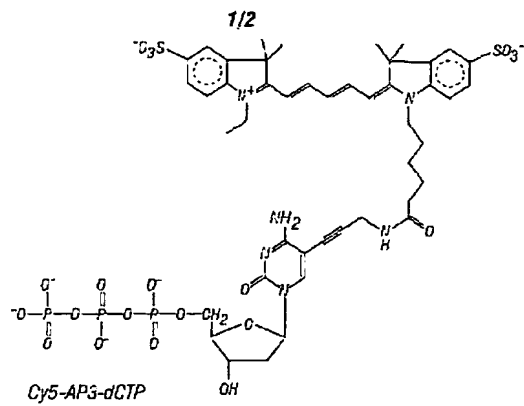


FIG. 1A

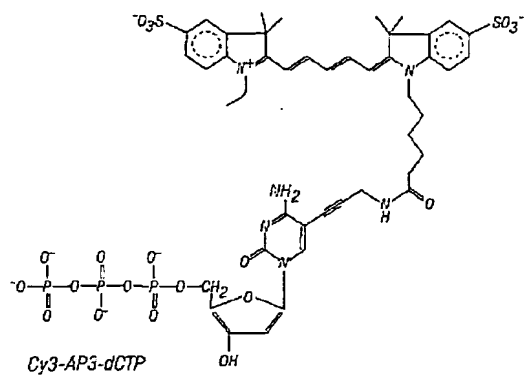


FIG. 1B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/44630

PCT/US2001/12836

2/2

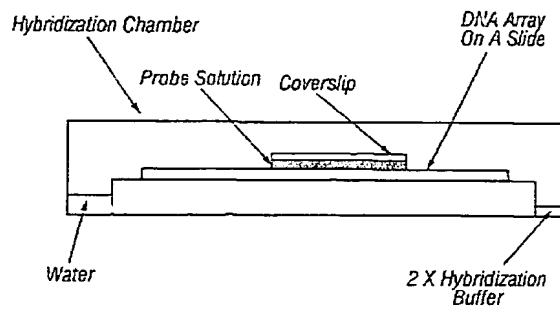


FIG. 2

【 国際公開パンフレット（コレクトバージョン） 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(10) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
13 December 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/094630 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
(21) International Application Number: PCT/JP01/2636
(22) International Filing Date: 19 April 2001 (19.04.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 09210-153 7 June 2000 (07.06.2000) US
(86) Related by continuation (118) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/210,153 (1.06.2000) / June 2000 (01.06.2000)
(71) Applicant (for all designated States except (26) BAY) OR COLLEGE OF MEDICINE (UNIVERSITY) State, USA, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030 (US)
(72) Inventors: and
(73) Inventor/Applicants (for US only): BRADLEY, Allen [GB/US]; 5127 Quenstedt, Houston, TX 77056 (US); CAL, Wm. Wm [CN/US]; 2250 Holly Hall 63101, Houston, TX 77054 (US)
- (74) Agent: FERNBERG, Gregory, P. Fish & Rosenbaum P.C., Suite 500, 1950 Le Jolie Village Drive, San Diego, CA 92122 (US)
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CD, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO (ARI) (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, NL, PT, SE, SI, SK, UK), OAPI (BF, BJ, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).
- Published:
— with international search report
(89) Date of publication of the international search report: 21 August 2001



WO 01/094630 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ARRAY-BASED NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION

(57) Abstract: The invention provides compositions and methods for generating a molecular profile of genomic DNA by hybridization of labeled nucleic acid representing the genomic DNA to immobilized nucleic acid probes, e.g., arrays or libraries.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Search Report Application No. PCT/US C1/12838
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/83		
According to International Patent Classification (IPC) or to other published classification and IPC		
B. FIELD OF SEARCH		
M. SEARCH DOCUMENTS SEARCHED (checked on system followed by classification system) IPC 7 C12Q		
C. DOCUMENTS RELEVANT TO THE INVENTION (checked on system followed by classification system and in the fields searched)		
D. OTHER DATA (checked on system followed by classification system and in the fields searched)		
EPC-Internal, MEDLINE, PAJ, MPI Data, BIOSIS		
F. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Relevance to the invention (checked on system followed by classification system)	Relevance to the prior art
X	EP 0 967 291 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 29 December 1999 (1999-12-29) * the whole document, in particular p. 3, 1. 35-39, p. 4 l. 57 to p. 5 l. 39 and claim 1	1-6, 10-13, 15, 16, 18, 22-25, 27
Y	---	7-9, 14, 17, 19-21, 26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Document categories of the documents: "A" document is the document of the invention, the document is not "B" document is the document of the invention, the document is not "C" document is the document of the invention, the document is not "D" document is the document of the invention, the document is not "E" document is the document of the invention, the document is not "F" document is the document of the invention, the document is not "G" document is the document of the invention, the document is not "H" document is the document of the invention, the document is not "I" document is the document of the invention, the document is not "J" document is the document of the invention, the document is not "K" document is the document of the invention, the document is not "L" document is the document of the invention, the document is not "M" document is the document of the invention, the document is not "N" document is the document of the invention, the document is not "O" document is the document of the invention, the document is not "P" document is the document of the invention, the document is not "Q" document is the document of the invention, the document is not "R" document is the document of the invention, the document is not "S" document is the document of the invention, the document is not "T" document is the document of the invention, the document is not "U" document is the document of the invention, the document is not "V" document is the document of the invention, the document is not "W" document is the document of the invention, the document is not "X" document is the document of the invention, the document is not "Y" document is the document of the invention, the document is not "Z" document is the document of the invention, the document is not		
Date of the latest publication of the international search report 18 December 2002		Date of making of the international search report 08 04 2003
Name and address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1, 7000 La Haye, The Netherlands Tel: +31 (0) 79 460 5250 Fax: +31 (0) 79 460 5251 PCT: +31 (0) 79 460 5251		Authorizing officer Pinto, V

Form PCT/US/2002 (Rev. 10/01)

International Application No.

PET/LS 31/22839

C/Centroid(s) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Referred to Centroid
Centroid	Contents of document, e.g., title, abstract, synopsis, of the relevant passage	
X	<p>WODICKA ET AL: "GENOME-WIDE EXPRESSION MONITORING IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE". NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 15, December 1997 (1997-12), pages 1359-1367, XP021100297 ISSN: 1037-2156 * in particular p. 1369, col.2 and p. 1366, col. 1. "Generic DNA labelling".</p>	<p>1-6,10, 12,15, 16,18, 22-25,27</p>
Y	<p>--- WD 99 07632 A (UNITED CALIFORNIA), 18 February 1999 (1999-02-18) the whole document</p>	<p>7-9,14, 17, 19-21,26</p>
Y	<p>--- POLLACK J R ET AL: "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays." NATURE GENETICS, UNITED STATES SEP 1999, vol. 23, no. 1, September 1999 (1999-09), pages 41-46, XP002221379 ISSN: 1061-4036 * see p. 46, "Labelling and hybridization") *</p>	<p>7-9,26</p>
A	<p>--- HEISKANEN M A ET AL: "Detection of gene amplification by genomic hybridization to cDNA microarrays." CANCER RESEARCH, UNITED STATES 15 FEB 2000, vol. 60, no. 4, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 799-802, XP002225137 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International Application No. PCT/US 01/12838
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Not: because they relate to subject matter not intended to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claims Not: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, namely:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Not: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(ii).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
The International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As no additional claims could be searched without first paying an additional fee, this Authority did not make payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims to which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in 2a claims; it is covered by claims Nos.:	
1-27	
Remarks on Protest:	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/12638

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-27

method for generating a molecular profile of genomic DNA, composition and kit comprising fragments of genomic nucleic acid of a size smaller than 230 bases and labeled with a detectable moiety.

2. Claims: 28-53

method for hybridizing a sample of nucleic acid targets labeled with a fluorescent label sensitive to oxidation to immobilized probes comprising the use of a solution comprising at least one antioxidant, composition and kit comprising a sample of (Cy5TM) fluorescent dye-labeled nucleic acid in a solution comprising at least one anti-oxidant.

3. Claims: 54-66

method for hybridizing a sample of nucleic acid targets to immobilized probes in a controlled hybridization environment, composition and kit comprising an array of immobilized nucleic acids in a housing, wherein the housing comprises (a) component(s) to measure/control humidity and/or temperature, and arrays of immobilized nucleic acids in a humidity-controlled housing.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information disclosed family members

International Application No.

PCT/US 01/12838

Parent document cited in search report		Publication date	Parent family member(s)	Publication date
EP 0967291	A	29-12-1999	EP 0967291 A1	29-12-1999
			JP 2000041687 A	15-02-2000
WO 99C7892	A	18-02-1999	US 6066453 A	23-05-2000
			CA 2388355 A1	18-02-1999
			EP 1612332 A1	28-06-2000
			JP 2001512697 T	28-08-2001
			WO 9907892 A1	18-02-1999
			US 2002152698 A1	19-12-2002

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/00

A

(81)指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ブラッドレー, アラン

アメリカ合衆国 77096 テキサス州, ヒューストン, クィーンズロック 5127

(72)発明者 カイ, ウィン, ウェン

アメリカ合衆国 77054 テキサス州, ヒューストン, ホリー ヘイル ナンバー 3101
2250

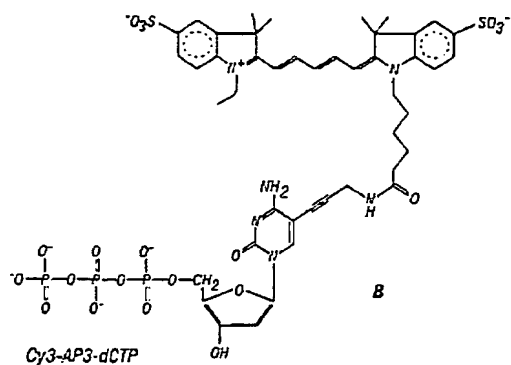
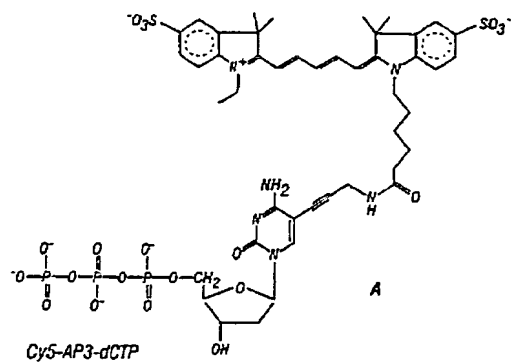
Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA04 CA09 HA12

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QS39

QX02

【要約の続き】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.